

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/12, C07K 14/475, C12N 5/10,</b> <b>C07K 16/22, A61K 31/70, 48/00, 38/18</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/37015</b>
		<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b>	9. Oktober 1997 (09.10.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP97/01590		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, CN, JP, KR, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 27. März 1997 (27.03.97)		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 12 463.8 28. März 1996 (28.03.96) DE			
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH [DE/DE]; Ingolstädter Landstrasse 1, D-85764 Oberschleißheim (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> DÖRMER, Peter [DE/DE]; Eichholzweg 7, D-82205 Gilching (DE).			
<b>(74) Anwalt:</b> BEHNISCH, Werner; Reinhard-Skupra-Weise & Partner, Postfach 44 01 51, D-80750 München (DE).			
<b>(54) Title:</b> PROTEIN WITH DIFFERENTIATION-INDUCING ACTIVITY FOR FRIEND'S ERYTHROLEUKEMIA CELL LINES			
<b>(54) Bezeichnung:</b> PROTEIN MIT DIFFERENZIERUNGSINDUZIERENDER AKTIVITÄT FÜR FRIEND-ERYTHROLEUKÄMIEZELLINIEN			
<b>(57) Abstract</b> A new protein is disclosed having at least a differentiation-inducing activity, in particular for Friend's erythroleukemia cell lines.			
<b>(57) Zusammenfassung</b> Erfindungsgemäß wird ein neues Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität, insbesondere für Friend-Erythroleukämiezelllinien, offenbart.			

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

PROTEIN MIT DIFFERENZIERUNGSINDUZIERENDER AKTIVITÄT FÜR  
FRIEND-ERYTHROLEUKAMIEZELLINIEN

Die Erfindung betrifft ein neues Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität, das aus Säugetierzellen, insbesondere dem Kulturüberstand von Säugetierzellen, isolierbar ist. Das Protein ist insbesondere aus murinen und menschlichen Zellen isolierbar.

Es war eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität, insbesondere für Friend-Erythroleukämiezelllinien, bereitzustellen.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch die Bereitstellung des Proteins mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien mit zumindest den Merkmalen a), b), c) und d) gelöst:

- a) isolierbar aus murinen myelomonozytären leukämischen Zelllinien;
- b) isolierbar aus bestrahlten humanen Knochenmarkstromazelllinien;
- c) induziert Differenzierung in Friend-Erythroleukämiezelllinien unter Hämoglobinbildung;
- d) mit einem Molekulargewicht im Bereich von etwa 10 - 60 kDa bestimmt durch Gelfiltration mit Sephacryl S300<sup>F</sup>;
- e) mit einer Expression der zugehörigen mRNA in primären Zellen aus Thymus, foetaler Leber, adulter Milz oder Knochenmark;
- f) mit charakteristischen Repeat-Strukturen in der für das Protein kodierenden cDNA;
- g) mit zugehörigen mRNA-Spezies unterschiedlicher Größe, die aus gleichen 3'-Bereichen, aber unterschiedlichen 5'-Bereichen bestehen.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein weist bevorzugt auch noch zumindest eines der nachfolgenden Merkmale auf:

- h) mit einer stabilen Expression der zugehörigen mRNA in vitro, wenn eine allogene Milzzell-Reaktion mit unbestrahlten, nicht vorbehandelten Milzzellen der Mausstämme CBA und C57Bl6 durchgeführt wird;
- i) induzierbar durch einen im fötalen Kälberserum vorkommenden Serumfaktor;
- k) mit AT-reichen Abschnitten in der für das Protein kodierenden cDNA.

Im Kulturüberstand einer murinen myelomonozytären leukämischen Zelllinie (WEHI-3) wurde eine Aktivität gefunden, die erythroide Zellen der Maus (Friend-Erythroleukämiezelllinien) zur Differenzierung unter Hämoglobinbildung induziert. Das Molekulargewicht der Aktivität liegt zwischen etwa 10 und 60 kDa, wobei verschieden große Proteinspezies oder Aggregate des Proteins angenommen werden. Die Expression der Aktivität ist abhängig von einem bislang nicht charakterisierten Serumfaktor, der sich in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Chargen von kommerziellem foetalen Kälberserum findet. Eine bezüglich der Wirkung identische Aktivität wurde auch im Überstand bestrahlter humaner Knochenmarkstromazellen (Zelllinie L88/5) gefunden. Die Aktivität erhielt die vorläufige Bezeichnung EDA (Erythroid Differentiation Activity). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden auch andere als Erythropoese-induzierende Funktionen gefunden (siehe unten). Auf die menschliche Leukämiezelllinie K562 konnte ebenfalls ein Erythropoese-induzierender Effekt von EDA nachgewiesen werden (Spezies-übergreifende Wirkung von EDA).

Durch Expressionsklonierung wurde eine kleine cDNA-Spezies des Gens gefunden (DY-8), die nach Transfektion in Cos-1 Zellen zu einem Kulturüberstand führte, der EDA-Aktivität hatte. Mit

dieser 715 bp großen cDNA als Sonde wurde ein größeres cDNA-Stück mit rund 1.350 bp isoliert (HA-15/2), das bei transienter Expression in Cos-1-Zellen und Verwendung des Cos-1-Überstandes ebenfalls eine schwache EDA-Wirkung aufwies. Das Gen wird in den untersuchten Zellen der Maus in verschiedenen RNA-Spezies (wahrscheinlich Spleißvarianten) von ca. 800, 1.200, 1.350, 1.750 und 2.200 bp exprimiert. Eine eda mRNA Expression in teilweise sehr geringem Umfang ließ sich in allen untersuchten Geweben nachweisen (Leber, Niere, Hirn, Darm, Plazenta). Die stärkste Expression findet sich im Thymus, gefolgt von foetaler Leber, adulter Milz und Knochenmark. Viele hämopoetische Zelllinien der Maus, besonders leukämisch transformierte wie DA-3, WEHI-3, NFS-60 oder NFS-61, aber auch nicht leukämisch transformierte wie NIH-3T3 oder TS1-C3, zeigen auf RNA-Ebene eine teilweise sehr starke Expression von eda.

Mit Hilfe der murinen eda Probe HA-15/2 gelang es, ein entsprechendes menschliches Gen sowohl auf DNA-Ebene durch Southern Blot Analyse unter stringenten Bedingungen, als auch auf RNA-Ebene durch Northern Blot Analyse nachzuweisen. Hierbei war insbesondere die Jurkat-Zelllinie positiv. Außerdem wurde eine deutliche Bande von ca. 1.100 bp bei einem Fall von menschlicher chronischer T-Zell-Leukämie vom T-Helferzelltyp gefunden, die in keiner anderen von 8 Proben von menschlichen Zelllinien und primärem menschlichen Knochenmarkmaterial erkennbar war.

In allen Versuchen zeigt die 2,2 kbp Bande der eda-mRNA das konstanteste Expressionsmuster. Ihr struktureller Aufbau, analysiert an NIH-3T3 Zellen, ist in Abb. 19 wiedergegeben. Die Repeat-Strukturen sind ein wichtiges Charakteristikum der eda cDNA (Tab. 3). Die zugehörige Sequenz, eine Konsensussequenz aus Klonen der WEHI-3 und der NIH-3T3 Zelllinien, ist in Abb. 18 wiedergegeben, die SEQ ID NO:1 entspricht. Alle mRNA Spezies, also die 800, 1.200, 1.350, 1.750 und 2.200 bp Banden, haben ein identisches 3'-Ende, in Abb. 19 als "Tail" bezeichnet, wohingegen noch unklar ist, ob es jeweils ein Banden-spe-

zifisches 5'-Ende gibt, oder ob die Banden unterschiedliche Spleißprodukte darstellen. Da die Differenzierungs-induzierende Wirkung auf erythropoetische Zellen mit dem Klon DY-8 gefunden wurde, der ca. 640 bp des 3'-Bereichs von eda und dazu 73 bp eines eigenen 5'-Endes (Abb. 20 enthält SEQ ID NO:2) enthält, ist die Differenzierungs-induzierende Funktion wesentlich mit an den 3'-Teil der cDNA gebunden.

Vergleiche der Bandengrößen der verschiedenen eda mRNA Spezies in unterschiedlichen Mausstämmen wie Balb/c, C3H, CBA, C57Bl6, Swiss, AKR oder NFS sowie von Teilsequenzen der eda cDNA von unterschiedlichen Mausstämmen lassen eine Mausstamm-abhängige Variabilität erkennen. Sie kommt durch unterschiedliche Häufigkeiten der verschiedenen Repeats in den einzelnen Mausstämmen zustande. Die starke Expression von eda in einigen Tumorzelllinien der Maus läßt eine Bedeutung für das Tumorstadium erwarten.

Da das 5'-Ende des offenen Leserahmens noch nicht zweifelsfrei definiert ist, wurde neben dem durch Expressionsklonierung gefundenen 177 Aminosäuren großen Protein SEQ ID NO:3 ein zweites, weiter 5' beginnendes 206 Aminosäuren großes Protein SEQ ID NO:5 in einer humanen Colonicarcinomzelllinie CX2 zur permanenten Expression gebracht. Dieses größere Protein hat eine 1 - 2 Verdünnungsstufen höhere Differenzierungs-induzierende Aktivität gegenüber murinen Friend-Erythroleukämiezellen.

Obwohl eda in vielen Zelllinien exprimiert wird, findet man in den Kulturüberständen von nur ganz wenigen Zelllinien EDA-Aktivität. Sie wird in den Überständen nachweisbar, wenn die Zellen bestrahlt werden, oder wenn ein weitgehender Proteinentzug erfolgt, also unter Streßbedingungen.

Die Untersuchung der Bedeutung von eda in normalen Milzzellen der Maus ergab, daß eine mitogene oder T-Zellrezeptor-spezifische Stimulation der Zellen oder eine Stimulation der Protein-

kinase C zu einem raschen Verschwinden der verschiedenen mRNA Spezies mit Auftreten von Abbauprodukten definierter Größe führt. Hingegen kommt es zu einer stabilen Expression, wenn eine allogene Milzzell-Reaktion mit unbestrahlten, nicht vorbehandelten Milzzellen der Mausstämme CBA und C57Bl6 durchgeführt wird. Die hieraus ableitbare Bedeutung einer Beteiligung an der allogenen Reaktion der Milzzellen wurde durch ein semi-allogenes Transplantationsmodell der Maus (C57Bl6-Milzzellen in letal bestrahlte CBAXC57Bl6 Mäuse injiziert) unterstrichen. In den Milzen der Versuchstiere kam es im Verlaufe der akuten "Graft-versus-Host"-Erkrankung im Vergleich zu denen der gewebeverträglich transplantierten Kontrollen zu einem etwa 7-fachen Anstieg der eda-Expression.

Bereits geringe Konzentrationen der rekombinanten Überstände der CX2-Zelllinie stimulieren die Burkitt Lymphomzelllinie BL-70 im Sinne eines Wachstumsfaktors. Auch auf hämatopoetische Progenitoren des Menschen in der Fraktion der CD34+ Knochenmarkzellen haben die rekombinanten Überstände der CX2 Zelllinie eine koloniestimulierende Wirkung.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein ist aus Säugetierzellen, bevorzugt aus dem Überstand von Säugetierzellkulturen, isolierbar. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird es aus murinen oder humanen Zellen isoliert. Bevorzugte Zelllinien sind beispielsweise: die murine myelomonozytäre leukämische Zelllinie WEHI-3, ATCC TIB68 und die bestrahlte humane Knochenmarkstromazelllinie L8815, DSM ACC 2056. Die Zelllinie L8815 wird nachfolgend auch als L88/5 bezeichnet. Die Friend-Erythroleukämiezelllinien F4N oder B8/3 dienen zum Nachweis des Proteins.

In der vorliegenden Anmeldung werden die einzelnen Zelllinien, aus denen das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein isolierbar ist und an denen die genannten Wirkungen aufzeigbar sind, nur beispielhaft genannt. Der Fachmann kann die Erfindung auch mit anderen Zelllinien als den genannten ausführen. Eine Hin-

terlegung dieser Zelllinien ist bereits aus diesem Grund nicht notwendig. Die Zelllinien werden weiterhin durch die im Literaturverzeichnis genannten Literaturstellen ausreichend und wiederholbar reproduzierbar beschrieben. Es wird nochmals darauf hingewiesen, daß zur Ausführung der vorliegenden Erfindung nicht zwingend auf die genannten Zelllinien zurückgegriffen werden muß, sondern daß auch andere, dem Fachmann durch Routinerversuche ermittelbare Zelllinien verwendbar sind.

Für WEHI-3 ist ein Computerausdruck aus dem ATCC-Katalog beigefügt; gleiches gilt für die Zelllinie K562. Auf die dort angegebenen Literaturstellen wird vollinhaltlich Bezug genommen.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein besitzt eine Aminosäureteilsequenz, die von einer mit der cDNA der SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO:4 hybridisierenden DNA kodiert wird. Die Hybridisierung erfolgt bevorzugt unter stringenten Bedingungen. Das Protein enthält zumindest diejenigen Aminosäuren, die von der in Abb. 20 als "Konsenssussequenz" bezeichneten Nukleotidsequenz kodiert wird. Deletionen, Insertionen, Austausch von Aminosäuren und Modifikationen von Aminosäuren sind insofern möglich, als die Funktionalität des Proteins nicht zerstört wird.

Stringente Bedingungen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind als solche Bedingungen definiert, die eine selektive und nachweisbare spezifische Bindung der Nukleinsäure an das für das erfindungsgemäße Protein kodierende Gen oder Transkripte des für das erfindungsgemäße Protein kodierenden Gens ermöglichen. Eine derartige Hybridisierung unter stringenten Bedingungen bedeutet vorzugsweise, daß nach einer Hybridisierung bei 65°C in einer wässrigen Lösung oder bei 42°C in 50% Formamid und anschließendem Waschen des Filters bei 60°C in einer wässrigen Lösung mit einer Salzkonzentration von 15 mM NaCl und einer SDS-Konzentration von 0,1% noch eine Bindung der Sonde an das für das erfindungsgemäße Protein kodierende Gen oder der hiervon abgeleiteten RNA nachweisbar ist. Bei Verwendung



von kürzeren Nukleinsäuren als Sonden kann es jedoch erforderlich sein, weniger drastische Hybridisierungs- und/oder Waschbedingungen zu verwenden.

Von der vorliegenden Erfindung werden auch Teile, Analoga und Derivate des erfindungsgemäßen Proteins sowie Fusionsproteine mit umfaßt. Das erfindungsgemäße Protein liegt bevorzugt in im wesentlichen gereinigter und nativer Form oder in im wesentlichen rekombinanter Form vor und weist zumindest eine differenzierungsinduzierende Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien auf.

Das erfindungsgemäße Protein weist eine differenzierungsinduzierende Aktivität auf. Diese Aktivität wurde sowohl für murine, durch den Friend-Virus transformierte Erythroleukämiezelllinien als auch auch für eine menschliche Leukämiezelllinie, nämlich K562, nachgewiesen. Es ist davon auszugehen, daß auch auf andere, verwandte Zelllinien, insbesondere auch auf humane Leukämiezelllinien, dieser Differenzierungs-induzierende Effekt nachweisbar ist. Weiterhin ist aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse davon auszugehen, daß diese differenzierungsinduzierende Aktivität nicht nur für erythropoetische Zellen, sondern auch für andere Zellen zutrifft. Weiterhin weist es eine Wachstumsfaktorwirkung sowie eine koloniestimulierende Wirkung auf.

In der Beschreibung und in den Patentansprüchen wird beispielhaft zur Charakterisierung des Proteins immer auf die differenzierungsinduzierende Aktivität auf Friend-Erythroleukämiezelllinien Bezug genommen. Weitere, erfindungsgemäß bereits nachgewiesene Aktivitäten sind in der vorliegenden Beschreibung dargestellt. Es ist davon auszugehen, daß das hier bereitgestellte Protein auch noch weitere Aktivitäten aufweist, die dem Protein inhärent sind. Die genannten Aktivitäten dienen somit lediglich zur genauen Charakterisierung und Differenzierung des Proteins und stellen keine abschließende Aufzählung seiner Merkmale, Eigenschaften und Aktivitäten dar.

So wurde erfindungsgemäß beispielsweise gefunden, daß das bereitgestellte Protein einen erythropoeseinduzierenden Effekt auf menschliche Leukämiezelllinien, beispielsweise K 562 (ATCC Nr. CRL243), aufweist.

Die vorliegende Erfindung umfaßt DNA-Fragmente gemäß SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO:4, Teile, Derivate und Analoga hiervon, je kodierend für ein Polypeptid mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien, die mit der cDNA nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO:4, bevorzugt unter stringenten Bedingungen, hybridisieren.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch DNA-Fragmente, die zumindest für einen Teil eines Polypeptids kodieren, welches die Aktivität des menschlichen oder murinen Proteins mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität, beispielsweise für Friend-Erythroleukämiezelllinien gemäß der vorliegenden Erfindung, besitzt.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin rekombinante Vektoren, die eine DNA-Sequenz enthalten, die einem Gen oder einem DNA-Fragment entspricht, das für ein Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien gemäß der Erfindung kodiert. Bei den erfindungsgemäßen Vektoren kann es sich um übliche, aus dem Stand der Technik bekannte Vektoren handeln, beispielsweise bakterielle Plasmide, Bakteriophagen oder virale Vektoren. Auch Expressionsvektoren werden mit umfaßt.

Die Erfindung umfaßt weiterhin Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäß bereitgestellten Vektor transformiert sind. Bei den Wirtszellen kann es sich um Prokaryonten- oder Eukaryontenzellen, beispielsweise E.coli-Zellen oder Hefezellen, handeln.

Die erfindungsgemäßen DNA-Fragmente gemäß SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO:4, Teile, Derivate oder Analoga hiervon, je ko-

dierend für ein Polypeptid mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien, werden erfindungsgemäß beispielsweise dadurch erhalten, daß eine menschliche oder murine cDNA-Klonbank unter Verwendung eines DNA-Fragments einer DNA, die für ein murines oder menschliches Protein mit differenzierungsinduzierender Aktivität kodiert, gescreent wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin monoklonale oder polyklonale Antikörper, die gegen mindestens ein Epitop eines Proteins mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien gerichtet sind.

Erfindungsgemäß wird weiterhin ein therapeutisches, diagnostisches oder experimentell nutzbares Mittel bereitgestellt, das als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure in einer wirksamen Menge enthält, die mit einem Gen oder einem Teil hiervon hybridisiert, und das für das erfindungsgemäße Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien kodiert.

Erfindungsgemäß bereitgestellt wird auch ein therapeutisches, diagnostisches oder experimentell nutzbares Mittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure enthält, die (a) die für ein Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil hiervon, (c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) und/oder (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleotidsequenz aus (a), (b) und/oder (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt. Die Nukleinsäure des Mittels ist eine ggf. modifizierte DNA oder RNA.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte therapeutische Mittel enthält das Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität, beispielsweise für Friend-Erythroleukämiezelllinien

der vorliegenden Erfindung, ein Analogon, Derivat oder Teile hiervon je mit zusammen mit üblichen Träger- und/oder Hilfsstoffen in einer wirksamen Menge.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte therapeutische, diagnostische oder experimentell nutzbare Mittel ist beispielsweise als molekulare Sonde in der Diagnostik oder als Antisense-Nukleinsäure zur Hemmung der Genexpression einsetzbar. Durch Verwendung von Antikörpern gegen dieses Mittel kann therapeutisch, diagnostisch oder experimentell Einfluß auf die differenzierungsinduzierende Wirkung genommen werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Transformation einer Prokaryonten- oder Eukaryontenzelle unter Verwendung einer DNA, die für das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien kodiert, sowie Teile, Derivate oder Analoga dieser DNA mit dieser Aktivität.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Fusionsprotein mit einer Aminosäuresequenz, die in ihrer Gesamtheit oder zum Teil aus der Aminosäuresequenz von menschlichem oder murinem Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien gemäß der Erfindung und einem Teil eines prokaryontischen oder eukaryontischen Proteins besteht.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein synthetisches Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien gemäß der Erfindung mit einer Aminosäuresequenz, die von einer DNA-Sequenz kodiert wird, die mit der DNA-Sequenz nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 zumindest unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein eignet sich bevorzugt zur Behandlung von Erkrankungen mit Störungen in der differenzierungsinduzierenden Aktivität erythropoetischer Zellen.

Einsatzgebiete:

Es eignet sich weiterhin bevorzugt zur Behandlung von Erkrankungen, bei denen die Blutzellbildung im Knochenmark und/oder in den lymphatischen Geweben krankheitsbedingt oder behandlungsbedingt beeinträchtigt ist.

Es eignet sich weiterhin bevorzugt zur Behandlung von Zellen der blutbildenden Gewebe innerhalb oder außerhalb des Organismus mit dem Ziel, eine Vermehrung von Vorläuferzellen und/oder Stammzellen der Blutbildung mit oder ohne genetischer Veränderung zu erreichen.

Es eignet sich weiterhin bevorzugt zur Beeinflussung von immunologischen Prozessen, bei denen im Sinne einer gemischten Milzzellreaktion Vorgänge der Zellerkennung oder Zellelimination ablaufen oder ablaufen sollen.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand der vorliegenden Abbildungen unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsbeispiele näher beschrieben. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die beschriebenen bevorzugten Ausführungsformen beschränkt.

Die Abbildungen zeigen:

- Abb. 1: Erythroide Differenzierungsinduktion in murinen F4N Erythroleukämiezellen durch 4 verschiedene WEHI-3-konditionierte Medien
- Abb. 2: Erythroide Differenzierungsinduktion in murinen B 8/3 Erythroleukämiezellen durch Kulturüberstände von der menschlichen Stromazelllinie L88/5, gemessen an den Tagen 3 und 4
- Abb. 3: Erythroide Differenzierungsinduktion in humanen K562 CML-Zellen durch 4 verschiedene WEHI-3-konditionierte Medien. Insbesondere mit dem WCM (C) ist ein Effekt erkennbar

- Abb. 4: Wirkung von WEHI-3-konditioniertem Medium auf Zellzahl und  $\alpha$ -Globinsynthese von B 8/3 Maus Erythroleukämiezellen
- Abb. 5: Wirkung von WEHI-3-konditioniertem Medium auf die Adhärenz von WEHI-3 Zellen am Plastikboden von Kulturgefäßen bei einer Kulturdauer von 72 Stunden. Messung der relativen Zellzahl durch MTT-Test
- Abb. 6: Gel-chromatographische Fraktionierung von WEHI-3-konditioniertem Medium mit Sephacryl S 300<sup>R</sup>. Biologische Testung der Fraktionen auf EDA-Aktivität mit B 8/3 Maus Erythroleukämiezellen in einer Kulturdauer von 4 Tagen. Gemessen wurde durch Northern Blot Analyse die Induktion von  $\alpha$ -Globin mRNA
- Abb. 7: Abhängigkeit der EDA-Produktion von der WEHI-3 Zelldichte bei der Ernte aus der primären, FCS-haltigen Kultur. Die Aktivität wurde durch 3-tägige Kultivierung von B 8/3 Maus Erythroleukämiezellen mit den WEHI-3 Überständen und Auszählen des Prozentsatzes Benzidin-positiver Zellen bestimmt
- Abb. 8: Fraktionierung des Überstandes von Versuch W3/2 (siehe Abb. 7) und Testung der Fraktionen durch 3-tägige Kultivierung mit B 8/3 Maus Erythroleukämiezellen und Auszählung des Prozentsatzes Benzidin-positiver Zellen
- Abb. 9: Schritte der Expressionsklonierung einer murinen eda-Sequenz durch graduelle Verminderung der in den biologischen Test einbezogenen Zahl von Klonen aus der Expressionsbibliothek
- Abb.10: Differenzierungsinduktion von murinen B8/3 Erythroleukämiezellen durch Cos-1 konditionierte Überstände in 3 unabhängigen Versuchen nach Transfektion mit

dem Klon DY-8 sowie einem irrelevanten Kontrollklon BY-7. Zum Vergleich wurde der Überstand von WEHI-3 Zellen als positiver Standard mitgetestet. Mittelwert  $\pm$  1 Standardabweichung der Einzelergebnisse vom Kontrollklon BY-7 sind als schraffierte Fläche wiedergegeben. Dazu sind im Vergleich  $\pm$  1 Standardabweichungen der Ergebnisse mit DY-8 als Balken dargestellt.

- Abb. 11: Expression der unvollständigen eda-Klone HA-15/2 und HA-12/1 in Cos-1 Zellen und Testen der Cos-1 Überstände in B8/3 Maus Erythroleukämiezellen in Kulturansätzen über 3 und 4 Tage. Ausgewertet wurde der Prozentsatz Benzidin-positiver Zellen. Am Tag 4 ist der Unterschied zwischen der Kontrolle und dem Ergebnis mit dem Klon HA-15/2 knapp über der 5% Signifikanzgrenze
- Abb. 12: Southern Blot Analyse von verschiedenen, EcoRI-geschnittenen Maus DNA's mit der murinen eda-Probe von HA-15/2. Analysiert wurde auch die DNA aus der humanen K562 Zelllinie (4. Bahn von links), die eine schwache Positivität durch Banden bei ca. 7,5 und 6,5 kbp bei hochstringenter Waschung erkennen läßt
- Abb. 13: eda Expression in der RNA der murinen Zelllinien NIH-3T3 (jeweils li.) und M2-10B4 (jeweils re.). Die Hybridisierung im Northern Blot wurde mit verschiedenen Proben, wie im Text beschrieben, durchgeführt
- Abb. 14: Northern Blot Analyse der RNA verschiedener humaner Zelllinien mit der murinen eda-Probe aus HA-15/2. Bei den Zelllinien H33, Reh und K562 wurden je 15  $\mu$ g Gesamt-RNA verwendet, bei der Jurkat-Probe ca. 5  $\mu$ g poly(A)+RNA

- Abb. 15: eda-Expression in murinen Milzzellen (Stamm C3H) nach Stimulation mit Anti-T-Zellrezeptor-Antikörper oder Concanavalin A. Die densitometrischen Ergebnisse der Auswertung von Northern Blots nach Hybridisierung mit der murinen eda-Probe aus HA-15/2 sind getrennt dargestellt für die großen eda-Banden von von 2.200 und 7.000 bp, sowie für die kleineren, wahrscheinlich Abbauprodukte bedeutenden Banden von 600 und 400 bp
- Abb. 16: eda-Expression in murinen Milzzellen der Mausstämme CBA und CBL bei Durchführung einer 3-tägigen gemischten Milzzellkultivierung. Als Kontrollen sind die eda-Expression in muriner Plazenta und muriner foetaler Leber (d 15) dargestellt. Northern Blot Analyse mit 5 - 15 µg Gesamt-RNA und Verwendung des eda-Klons HA-15/2 als Sonde. Die Beladung der einzelnen Bahnen ist aus der anschließenden Hybridisierung der RNA-Proben desselben Filters mit einer Sonde für 28 S-RNA ablesbar
- Abb. 17: Expression der 2,2 kbp eda-mRNA Spezies bei semi-allogener Transplantation (CBL-Zellen in (CBA x CBL) F<sub>1</sub>-Hybride), bzw. autologer Transplantation von CBA x CBL-Milzzellen in (CBA x CBL) F<sub>1</sub>-Hybride. Transplantiert wurden pro Tier 5 x 10<sup>7</sup> Milzzellen. Die eda-Expression von CBL-Zellen am Tag 0 wurde 100% gesetzt. Northern Blot Analyse von je 15 µg Gesamt RNA pro Bahn mit der murinen eda-Probe von HA-15/2
- Abb. 18: Konsensus-Teilsequenz der 2.200 bp eda cDNA. Diese Sequenz hat keinen durchgehenden offenen Leserahmen, wobei auch das Fehlen einzelner Abschnitte innerhalb der Sequenz möglich ist.
- Abb. 19: Vorläufige Struktur der 2,2kb eda-cDNA. Abkürzungen: R 1-1 bis R 1-3 = 81 bp Repeats Nr. 1-3; R 2-1 und R



2-2 = ca. 180 bp Repeats Nr. 1 und 2; Tail = 3'-Ende des Gens, für alle mRNA-Spezies identisch; Unbekannt = ca. 300 bp bisher nicht bekannter Sequenz; Start? = 81 bp großer Abschnitt aus dem 5'-Bereich, dessen exakte Lokalisation innerhalb der Anfangssequenz der 2,2 kb eda-cDNA noch bestimmt werden muß. Der durch Expressionsklonierung gefundene offene Leserahmen liegt im schwarzen Teil des als "Tail" bezeichneten Abschnitts, wobei ein 385 bp großer Repeat (R 3-1) nur in 2 von 32 Klonen vorhanden war und wahrscheinlich vor der Translation zur Beseitigung von Stopcodon und "Frameshift" herausgespleißt wird

Abb. 20: Sequenz des 715 bp Klons DY-8. Die ersten 73 bp (kursiv) bestimmen das für diesen Klon eigene 5'-Ende. Ab Position 74 besteht eine weitgehende Übereinstimmung mit dem 3'-Teil der presumptiven 2,2 kbp eda Spezies, markiert durch die Bezeichnung "Konsensussequenz". Die kodierende Sequenz für 177 Aminosäuren beginnt mit dem durch eine Box markierten ATG bei Position 155 und ist fett dargestellt. In der unteren Reihe ist eine fast identische Sequenz von 636 bp dargestellt, bei der in Position 52 ein ATG künstlich eingefügt wurde, und die dadurch einen offenen Leserahmen für 206 Aminosäuren aufweist.

Abb. 21: Differenzierungs-induzierende Wirkung verschiedener konditionierter Medien auf die murine Erythroleukämiezelllinie B8/3. Die Werte der Medienkontrollen ( $\pm$  1 Standardabweichung) sind durch einen grauen Balken dargestellt. Die Kontrolle mit CX-2 überstand nach alleiniger Vektortransfektion ist als "CX-2 + Rc/CMV" gekennzeichnet. Als positive Kontrolle fungierte das Standard-WCM (WEHI-3 CM)

Abb. 22: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen des Überstandes der klonierten, mit dem 534 bp eda im Rc/-CMV-Vektor transfizierten CX2 Zelllinie (CX2-C9) auf das Wachstum von Zellen der Burkitt Lymphomzelllinie BL-70. Gemessen wurde die O.D. in Mikrowells nach 4 Tagen Kulturdauer mit Hilfe des MTT-Tests. A: Abhängigkeit des Wachstums von der Zellkonzentration bei der Einsaat in Mikrowells ohne und mit unterschiedlichen Konzentrationen des CX2-Überstandes. B: Abhängigkeit des Wachstums der BL-70-Zellen im selben Versuch von der Konzentration des zugegebenen rekombinanten CX2-Überstandes, dargestellt für 3 verschiedene Zelldichten

Abb. 23: Methylcellulose-Kulturen von menschlichen CD34+ Knochenmarkprogenitoren mit und ohne Zugabe von eda in 2 verschiedenen Konstrukten. A: Bestimmung der Zahl gemischter Kolonien eines gesunden Spenders nach 20 Tagen Kulturdauer in Ansätzen mit und ohne Zugabe von 10% des Überstandes der Blasencarcinomzelllinie 5637. Verwendet wurden Überstände von transfizierten, aber nicht klonierten CX2-Zellen in 2 verschiedenen Konzentrationen (5 und 17%). \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ . B: Verwendet wurde der Überstand einer klonierten und mit dem 534 bp eda im Vektor Rc/-CMV transfizierten CX2-Zelllinie (CX2-C9). Dargestellt sind die Koloniezahlen von BFU-E und GM-CFC nach 14 Tagen von einem gesunden Knochenmarkspender (oberer Teil) und einem Patienten mit CML (unterer Teil).

Die beiliegenden Tabellen zeigen:

Tabelle 1: Die prozentuale Verminderung der EDA-Aktivität

Tabelle 2: Zytokine ohne differenzierungsinduzierende Ak-

tivität auf Maus-Erythroleukämiezellen

Tabelle 3: Repeatstrukturen in der presumptiven Konsensus-Teilsequenz der 2.200 bp eda-DNA.

### Material und Methoden

#### Zelllinien:

Mit den folgenden Zelllinien wurden Untersuchungen durchgeführt: Die murine myelo-monozytäre Leukämiezelllinie WEHI-3 (Warner et al., 1979, ATCC Nr. TIB 68), die murine embryonale Fibroblastenlinie NIH-3T3 (ATCC Nr. CRL 1658), die humane, aus einer chronischen myeloischen Leukämie entstandene Linie K562 (Lozzio und Lozzio, 1975, ATCC Nr. CRL 243), die humane ALL Zelllinie Reh (Rosenfeld et al., 1975, ATCC Nr. CRL 8286), die von der Jurkat Zelllinie abstammende Linie H33HJ-JA1 (ATCC Nr. CRL 8163), sowie die Affennierenzelllinien Cos-1 (ATCC CRL 1650) und Cos-7 (ATCC CRL 1651) wurden von ATCC bezogen. Die murinen Zelllinien NFS-60 und NFS-61 (Holmes et al., 1985), DA-3 (Ihle et al., 1984) und FDCP-1 (Dexter et al., 1980) stammen von J. Ihle, Dept. of Biochemistry, St.Jude's Hospital, Memphis, Ten., U.S.A. Die murine myeloische Linie 32DC123 (Greenberger et al., 1983) ebenso wie die murine T-Helferzelllinie TS1-C3 (Uyttenhove et al., 1988) und die murine Thymom-Linie EL-4 (Farrar et al., 1983) stellte L. Hültner aus dem GSF-Institut für Experimentelle Hämatologie zur Verfügung. Von ihm stammte auch die Mastzelllinie L138.8A (Hültner et al., 1989). Die murinen Friend Erythroleukämiezelllinien F4N (Ostertag et al., 1972; Dube et al., 1975) und B8/3 (Ostertag et al., 1973; Ostertag et al., 1974) wurden von W.Ostertag, Abteilung für Virologie, Heinrich Pette-Institut, Hamburg, überlassen. Die humane T-Lymphomzelllinie Jurkat wurde uns von S.Thierfelder, GSF-Inst. f. Immunologie, München überlassen, und die murine Knochenmarkstromazelllinie M2-10B4 (Lemoine et al., 1988) stammt von C. Eaves, Terry Fox Institute, Vancouver, Kanada. Die humane Knochenmarkstromazelllinie L88/5 war bei uns im In-

stitut aus dem Knochenmark eines gesunden Spenders durch Transfektion mit einem Replikations-defizienten SV-40 Virus-konstrukt etabliert worden (Thalmeier et al, 1994). Bei der Zelllinie CX-2 handelt es sich um eine mäßig differenzierte menschliche Colonicarcinom-Kulturzelllinie, die 1979 als Xenograft in Nacktmäusen etabliert wurde (Ovejera et al., 1979). Sie wurde uns von G. Multhoff, GSF-Inst. f. Klinische Hämatologie, überlassen. Die Burkitt Lymphom Zelllinie BL-70 wurde von Lenoir et al. (1985) in Kultur gebracht und von G.W. Bornkamm, GSF-Inst. f. Klinische Molekularbiologie, zur Verfügung gestellt.

#### Mäuse:

Alle Mäuse wurden aus der GSF-eigenen pathogenfreien Zucht bezogen. Folgende Stämme wurden verwendet: C3H, Balb/c, CB1 (C57Bl6), CBA und AKR.

#### Medien für die Zellkultur:

Die Medien stammten von Life Technologies, D-76339 Eggenstein. Alle Zelllinien, soweit im folgenden nicht anders spezifiziert, wurden in RPMI-1640 mit 2 mM l-Glutamin sowie je 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies) kultiviert. Dieses Medium enthielt weiter 10% foetales Kälberserum (FCS), das wir von verschiedenen Herstellern bezogen und auf die besonders gewünschten Eigenschaften (z.B. Unterstützung der Differenzierungs-Induktion oder optimale Proliferation) hin speziell austesteten. Zur Gewinnung von WEHI-3 konditioniertem Medium wurde ein serumarmes Medium aus RPMI-1640 Medium analog zu den Angaben von Guilbert und Iscove (1976) hergestellt. Dieses enthielt 0,1% bovines Serumalbumin, 2 mM l-Glutamin, 20 E Penicillin/ml, 20 µg/ml Streptomycin, 32 mg/ml Eisen-gesättigtes humanes Transferrin,  $10^{-5}$ M l- $\alpha$ -Dipalmitoylle-cithin,  $2 \times 10^{-5}$ M Ölsäure und  $2 \times 10^{-5}$ M Cholesterin. Für die Kultivierung von Cos-Zellen wurde Dulbecco's Medium mit 4,5 g/l D-Glucose, 10% FCS, 2 mM l-Glutamin und 100 E/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin verwendet.

Für die Kultivierung von Progenitoren aus dem menschlichen Knochenmark wurde der BFU-E Test in Methylcellulosekulturen durchgeführt. Die Methylcellulose (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Kanada) wurde zu 0,9% in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Life Technologies, D-76339 Eggenstein) mit 30% ausgewähltem foetalen Kälberserum, 1% Rinderalbumin,  $10^{-4}$ M 2-Mercaptoäthanol, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin, 3 U/ml Erythropoetin, 100 ng/ml rmu Kit-Ligand sowie entweder 10% vom Überstand der humanen Blasencarcinomzelllinie 5637 (Takaue et al., 1987) oder einem "Cytokincocktail" verwendet. Der "Cytokincocktail" bestand aus 20 ng/ml rh GM-CSF, 20 ng/ml rh G-CSF, 20 ng/ml rh IL-3 und 20 ng/ml rh IL-6.

#### Bakterienstämme:

Die Stämme DH5 (Life Technologies, D-76339 Eggenstein) und Sure<sup>R</sup> (Stratagene, D-69044 Heidelberg) wurden verwendet.

#### Bakterienmedien:

Die Bakterien wurden routinemäßig in LB-Medium (Sambrook et al., 1989) kultiviert. Zur Transformation (Hanahan, 1983) wurde auch SOC-Medium nach den Angaben von Sambrook et al. (1989) verwendet.

#### Vektoren:

Als prokaryontisch-eukaryontischer Shuttlevektor und Expressionsplasmid zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek wurde ein 3.753 bp großer Vektor-Primer nach dem Prinzip von Okayama und Berg (1982) der Fa. USB, Cleveland, Ohio, U.S.A. verwendet. Dieses Plasmid pXPRS+ (Pruitt, 1988) enthält einen SV40 Origo. Die Genexpression wird in eukaryontischen Zellen vom frühen SV40 Promotor gesteuert. Außerdem enthält es eine SV40 Polyadenylierungsstelle. Für stabile Transfektionen wurde der 5.446 bp große Vektor Rc/CMV (Invitrogen, Holland) verwendet, bei dem die Transcription der Inserts über einen CMV-Promotor gesteuert wird und die Selektion über ein Neomycin-Resistenzgen erfolgt.

Darüber hinaus wurde eine cDNA-Bibliothek in Lambda-Phagen angelegt unter Verwendung des Vektors Lambda-Zap II<sup>R</sup> (Fa. Stratagene, La Jolla, CA., U.S.A.). Dieser Lambda-Phage erlaubt bei Verwendung eines geeigneten Bakterienstammes, z.B. Sure<sup>R</sup>, die Blau-Weiß-Selektion und enthält ein Plasmid (pBluescript<sup>R</sup> SK-), das durch den Helferphagen R408 zusammen mit dem Insert aus dem  $\lambda$ -Phagen herausgeschnitten werden kann.

#### Methoden:

Zur Zell- oder Organentnahme von Mäusen wurden die Tiere in Äthernarkose getötet. Für die RNA-Gewinnung kamen die Organe sofort in flüssigen Stickstoff und wurden aus diesem durch Zerkleinerung in gefrorenem Zustand in einem vorgekühlten Mörser unter Zugabe von Guanidinderhodanidpuffer weiter aufgearbeitet. Knochenmarkzellen wurden mit einer 12-Nadel mittels RPMI-Medium + 10% FCS aus den Diaphysen von Femur und Tibia gespritzt und durch ein Sieb gegeben. Milzzellen wurden durch grobe Zerkleinerung der Organe mit einer Schere und durch Reiben durch ein Sieb mit Hilfe eines Spritzenstempels unter Zugabe von RPMI-Medium + 10% FCS gewonnen.

Die Gesamt-RNA von Zellen wurde durch saure Phenolisierung nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) gewonnen. Daraus wurde bei Bedarf die mRNA durch Hybridisierung an Oligo(dT), das über Streptavidin-Biotin an Magnetpartikel gebunden wurde (PolyAtract<sup>R</sup>, Fa. Promega-Serva, D-69042 Heidelberg), isoliert. Die Isolierung von genomischer DNA erfolgte mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender Proteinase K-Behandlung und Phenolisierung.

Hochkompetente Bakterien ( $\sim 1 \times 10^9$  Kolonien/ $\mu$ g DNA) wurden nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990) durch Kultivierung der Bakterien bei 18°C bis zu einer OD von 0,6 erhalten. Die Bakterien wurden in einen MnCl<sub>2</sub>- und CaCl<sub>2</sub>-haltigen Puffer überführt und mit 7% DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert. Die cDNA-Synthese mit Hilfe des Vektor-Primers pXPRS+ wurde mit dem Kit Clonstruct<sup>R</sup> der Fa. USB, Cleveland, Ohio, U.S.A., nach

den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurde der poly(A)-Teil der mRNA von WEHI-3 Zellen an einen poly(T)-Teil des offenen Vektor-Primers gebunden, und an diesem wurde anschließend die Erst- und Zweitstrangsynthese durchgeführt. Mittels terminaler Transferase wurde ein poly(C)-Teil an das 5'-Ende des Inserts synthetisiert und ein komplementärer poly(G)-Strang durch Restriktion des 3'-Endes mit BstXI zur Ligation geschaffen. Hochkompetente DH5 Bakterien wurden nach den Angaben von Inoue et al. (1990) mit diesen ligierten Vektoren transformiert, wobei insgesamt etwa  $5 \times 10^5$  Transformanten erhalten wurden. Diese wurden 1x in 500ml LB-Medium amplifiziert zur anschließenden Isolierung der Plasmid-DNA mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Ein Aliquot der so erhaltenen DNA-Bibliothek wurde auf einem 1%igen Agarosegel geschnitten nach Größen getrennt. Unter Zuhilfenahme einer supercoilten DNA-Referenz (Life Technologies, D-76339 Eggenstein) wurden Plasmide mit Insertgrößen von 600 bis 2.500 bp aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die so gewonnene DNA wurde zur erneuten Transfektion hochkompetenter DH5 Bakterien im Rahmen der Expressionsklonierung verwendet.

Zur Herstellung der Phagenbibliothek aus NIH-3T3 mRNA wurde der Time Saver<sup>R</sup> cDNA-Synthesekit der Fa. Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg nach Vorschrift des Herstellers verwendet. An beide Enden der cDNA wurden NotI-EcoRI-Adaptoren ligiert. Die EcoRI-Schnittstellen wurden mit denen des EcoRI-geschnittenen Lambda ZapII<sup>R</sup>-Phagen der Fa. Stratagene, La Jolla, CA., U.S.A., ligiert. Anschließend wurden die Phagen mit dem Verpackungskit Gigapack II<sup>R</sup> der Fa. Stratagene verpackt und nach Vorschrift dieses Herstellers zur Infektion von Sure<sup>R</sup>-Bakterien verwendet. Nach Selektion positiver Klone mit einer radioaktiven Sonde wurden die Inserts zusammen mit dem Plasmid pBlueskript<sup>R</sup> SK- durch den Helferphagen R408 aus den Lambda-Phagen herausgeschnitten.

Die Gelelektrophorese von DNA erfolgte standardmäßig mit 0,8 bis 1,5% Agarosegelen. DNA-Fragmente wurden in Low Melting

Point Agarose SeaPlaque<sup>®</sup> GTG<sup>®</sup> (FMC Bio Products, Rockland, ME., U.S.A.) getrennt und dann herausgeschnitten. Mit GELase<sup>®</sup> (Biozym Diagnostik GmbH, D-31833 Hess. Oldendorf) wurde anschließend die Agarose nach Vorschrift des Herstellers verflüssigt. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe von Microcon 100<sup>®</sup> Konzentratoren (Amicon GmbH, D-58453 Witten). Für die analytische Fraktionierung von RNA wurden 2,2 M Formalin-1,2% Agarose-Gele verwendet. DNA- und RNA-Gele wurden zur Hybridisierung auf Hybond-N<sup>®</sup> Nylonfiltermembranen (Amersham-Buchler, D-38110 Braunschweig) mit Hilfe einer VacuBlot<sup>®</sup>-Apparatur (Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg) geblottet. Der radioaktive Nachweis bestimmter DNA- oder RNA-Banden auf den Nylonmembranen erfolgte durch Markierung der entsprechenden Sonden mit <sup>32</sup>P-dCTP mit Hilfe des Random Primed DNA Labeling Kits der Fa. Boehringer Mannheim. Nach Waschung der hybridisierten Filtermembranen entsprechend der gebotenen Stringenz nach den Vorschriften von Sambrook et al., 1989, wurden Röntgenfilme mit diesen Filtern exponiert. Zur Quantifizierung wurden Fuji Imaging Plates (Fa. Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan) mit den Filtern exponiert und in einem Fuji Phospo-Imager digitalisiert und per Computer ausgewertet. Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten erfolgte über das Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977) unter Verwendung von Di-Desoxynucleotiden.

Die Transfektion von Cos-1 und Cos-7 Zellen erfolgte mit Hilfe der DEAE-Dextran-Methode (Cullen, 1987). Nach 30 min Inkubation der Zellen mit 500 ng DNA/3,5 cm<sup>2</sup> Kulturschale und 5% DEAE-Dextran, und nach 2,5-std. Inkubation mit 80 µM Chloroquin wurde anstelle des in der Vorschrift angegebenen DMSO-Schocks eine 3-minütige Inkubation mit 15% gepuffertem Glycerin durchgeführt. Dadurch wurde ein deutlich niedrigerer Background der Differenzierungsinduktion durch die Cos-Zellüberstände erreicht. Die konditionierten Cos-Überstände wurden nach 72 Stunden geerntet und in geometrischen Verdünnungsreihen mit initial 50% Überstand den murinen Erythroleukämiezellen der Linien F4N oder B8/3 in 96-Mikrowellplatten zugesetzt. Die Differenzierungsinduktion in diesen Ansätzen wurde durch



Auszählen des Prozentsatzes Benzidin-positiver Zellen nach 3 und/oder 4 Tagen bestimmt. Dazu wurde eine Stammlösung von 10 mg N,N,N',N'-Tetramethylbenzidin (Sigma Biochemicals, D-82039 Deisenhofen) in 10 ml 12% Essigsäure angesetzt (NTMB-Lösung). Unmittelbar vor der Färbung wurde eine Verdünnung von 35  $\mu$ l NTMB-Lösung mit 35  $\mu$ l Isopropanol und 5  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angesetzt. Je nach Zelldichte wurden 5 -10  $\mu$ l der Zellen in ein neues Mikrowell pipettiert und mit frischem RPMI 1640 Medium mit 10% FCS auf 100  $\mu$ l aufgefüllt. Dazu wurden 5  $\mu$ l der verdünnten NTMB-Lösung gegeben. Zwischen 10 und 30 Minuten danach wurden die Benzidin-positiven Zellen prozentual auf Grund ihrer Grünfärbung unter einem Umkehrmikroskop in den Mikrowells ausgezählt.

Die stabile Transfektion von CX2-Zellen erfolgte mit dem Transfektionskit LipofectAMINE<sup>R</sup> der Fa. Life Technologies, D-76339 Eggenstein, nach den Vorschriften des Herstellers. Pro well einer 6-well-Platte (= 10 cm<sup>2</sup>, Fa. Nunc GmbH, 65203 Wiesbaden) wurden 4  $\mu$ l LipofectAMINE<sup>R</sup> verwendet.

Zur Herstellung von WEHI-3 konditionierten Medien wurden die Zellen 3 Tage zuvor in einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$ /ml in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und den üblichen anderen Zusätzen ausgesät. Nach 3 Tagen waren die Zellen auf Dichten zwischen  $3,5 \times 10^5$  und  $1,2 \times 10^6$ /ml herangewachsen. Sie wurden abzentrifugiert und 1x in RPMI 1640 Medium ohne Zusätze gewaschen und dann in serumarmem Medium auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt. Nach 3 Tagen wurde das konditionierte Medium geerntet und nach scharfer Abzentrifugation mit einem Amicon<sup>R</sup> 10 Konzentrator 10-fach eingeeengt. Diese WEHI-3-konditionierten Medien (WCM's) wurden aliquotiert und bei -20°C eingefroren. In dieser Form waren die Überstände über 3 Jahre mit einem allmählichen 2- bis 8-fachen Aktivitätsverlust haltbar.

Zur Fraktionierung wurde 20- bis 50-fach konzentriertes WCM durch Gelfiltration mit Sephacryl S300<sup>R</sup> in einem Gelbett von 90 x 2,6 cm mit PBS als Laufpuffer und einer Laufgeschwindigkeit

von 10 ml/min in einzelne Fraktionen aufgetrennt und bei 280 nm detektiert. Als Molekularstandards dienten BSA (68 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa) und Zytochrom C (12,5 kDa).

Die relative Zellzahl pro Mikrowell in 96-well-Platten wurde mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt (Mosmann, 1983). Hierbei wird die Fähigkeit der Zellen gemessen, das gelbe Tetrazoliumsalz von 3-(4,5 Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in das violette MTT-Formazan umzuwandeln. Diese Fähigkeit ist an die Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien gebunden, womit letztlich die Zellzahl relativ über die Anzahl aktiver Mitochondrien bestimmt wird. Die Farbintensität wurde mit einem Elisa-Reader (SLT, Salzburg) bei einer Testwellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt.

Die Adhärenz von WEHI-3-Zellen wurde nach Inkubation mit WCM durch ihr Anhaften an den Plastikboden von 96-well-Platten (Nunc GmbH, 65203 Wiesbaden) getestet. Dazu wurde der Überstand aus den einzelnen Mikrowells entnommen und der Boden der Mikrowells 1 x mit frischem Medium (RPMI 1640 ohne Zusätze) gespült. Nach Absaugen des Mediums mit den losgelösten Zellen im Überstand wurde frisches RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 2 mM l-Glutamin hinzugefügt und der MTT-Test durchgeführt. Die losgelösten und zuvor bereits im Überstand schwimmenden Zellen wurden in neue Mikrowells pipettiert und in gleicher Weise durch den MTT-Test gemessen.

Zur Isolierung von CD34+ Zellen aus dem menschlichen Knochenmark wurden Percoll-getrennte mononucleäre Knochenmarkzellen mit paramagnetischen Plastikkügelchen (Dynabeads<sup>R</sup>) inkubiert, die mit dem gegen CD34 gerichteten monoklonalen Antikörper BI-3C5 beschichtet waren (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg). Durch einen permanenten Magneten wurden die mit Dynabeads<sup>R</sup> besetzten CD34+ Zellen separiert, und anschließend wurden die Dynabeads<sup>R</sup> durch eine spezifische Antikörperpräparation derselben Firma (DETACHaBEADS<sup>R</sup>) von den CD34+ Zellen wieder abgelöst. Die gesamte Prozedur wurde nach Vorschrift der Fa. Dynal durchge-

führt.

Die Koloniezahlen in den Kulturen von menschlichen CD34+ Knochenmarkzellen wurden nach 14 - 21 Tagen mit einem Umkehrmikroskop ausgewertet. Dabei wurden alle hämoglobinierten Kolonien und solche, die ihnen morphologisch bis auf die Hämoglobinfärbung glichen, als BFU-E gezählt, alle Kolonien, die keine BFU-E enthielten, als GM-CFC zusammengefaßt, und solche Kolonien, die aus mindestens 2 verschiedenen Zelltypen gebildet wurden, separat davon als gemischte Kolonien registriert.

### Ergebnisse

#### EDA-Aktivitäten in verschiedenen Zelllinien:

Abb. 1 zeigt den Einfluß von 4 verschiedenen WEHI-3 konditionierten Medien auf die Zahl Benzidin-positiver F4N-Zellen, und damit auf die Differenzierung und Hämoglobinisierung dieser Zellen. Als positive Kontrolle ist die Zahl Benzidin-positiver Zellen bei Inkubation mit 1,2% DMSO dargestellt. Mit DMSO werden bis zu 70% der F4N-Zellen am 4. Tag positiv. Bei vergleichbarer Stärke der Differenzierungsinduktion mit WCM in diesem Versuch ist die Kinetik jedoch eine andere als mit DMSO: Erst am Tag 3 wird durch WCM in diesen Zellen eine Differenzierung induziert, die sich deutlich von den negativen Kontrollen unterscheidet. Diese Aktivität im WCM, gemessen an murinen Friend Erythroleukämiezellen, erhielt die Arbeitsbezeichnung "EDA" für **Erythroid Differentiation Activity**. Die Stärke der Differenzierungsinduktion mit demselben WCM unterlag in den einzelnen Versuchen stärkeren, auf die Differenzierungsbereitschaft der Erythroleukämiezellen zurückzuführenden Schwankungen. Faktoren des Mediums, des FCS und die Ausgangszelldichte der Erythroleukämiezellen waren von Bedeutung. Routinemäßig wurde deshalb in solchen Untersuchungen ein Referenz-WCM als positive Kontrolle mituntersucht. EDA wurde nicht nur in Überständen von WEHI-3 Zellen gefunden, sondern, in schwächerer Konzentration, auch in solchen von NIH-3T3 Zellen,

wenn diese in 1% FCS kultiviert wurden, und auch in Überständen der humanen Knochenmarkstromazelllinie L88/5, allerdings erst nach Bestrahlung und einer längeren Kultivierungsdauer (Abb. 2).

#### EDA-Wirkung auf murine und humane Zellen:

Der auf die Mauszellen wirkende Faktor kann demnach sowohl murinen als auch humanen Ursprungs sein. Auch der murine Faktor im WCM hat eine schwache Wirkung auf die humanen K562 Zellen, die sich durch DMSO nicht zur erythropoetischen Differenzierung induzieren lassen (Abb. 3, insbesondere WCM (C)). Die mit EDA bezeichnete Aktivität ist demnach in beiden Richtungen Spezies-übergreifend.

#### Biologische Eigenschaften der untersuchten Aktivität:

Die Wirkung von EDA auf Erythroleukämiezellen der Maus ist nicht primär eine Proliferationshemmung. Obwohl in vielen Versuchen eine Proliferationshemmung bei höheren Konzentrationen des Faktors von erheblicher Bedeutung war, zeigen Versuche wie z. B. in Abb. 4 dargestellt bei deutlicher Differenzierungsinduktion, erkennbar an der Zunahme der  $\alpha$ -Globin mRNA Expression, keinen Einfluß auf die Proliferation. Diese Differenzierungsinduktion war mit einer Downmodulation der c-myc Transkriptmenge verbunden, die sich auch bei Inkubation anderer Zellarten wie 32DC123 mit WCM deutlich nachweisen ließ, und die darüberhinaus mit einer konzentrationsabhängigen Verlängerung der c-myc mRNA Halbwertszeit verbunden war. Da eine Downmodulation von c-myc in vielen hämopoetischen Zellsystemen im Rahmen einer Differenzierung zu finden ist, wird angenommen, daß die erythropoetische Differenzierungsinduktion von EDA nur die Wirkung auf eines von mehreren Zellsystemen darstellt. In diesem Sinne ist möglicherweise die von uns nachgewiesene Zunahme der Adhärenz von WEHI-3-Zellen durch ihr eigenes konditioniertes Medium (Abb. 5) als auto-induktive Wirkung im Sinne einer Differenzierungsinduktion zu werten. Die Zunahme der Adhärenz dieser myelomonozytären Zellen bedeutet in diesem Zusammenhang einen Differenzierungsschritt in die Richtung von

Makrophagen. Nach diesen Befunden und bei der Annahme, daß die Effekte ebenfalls durch EDA bedingt wurden, besteht die Möglichkeit, daß es sich bei EDA um einen Faktor handelt, der zumindest in hämopoetischen Zellen ganz allgemein Differenzierung induziert.

#### Physikalische und chemische Eigenschaften von EDA:

Einige physikalischen und chemischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

#### Ausschluß einzelner Zytokine als Verursacher der EDA-Wirkung:

Theoretisch kommt eine Reihe von Zytokinen als Verursacher der Wirkungen in Betracht, die im Differenzierungsassay mit den murinen Erythroleukämiezellen beobachtet werden. Verschiedene Zytokine konnten als Verursacher ausgeschlossen werden. (Tab. 2).

#### Fraktionierung von WEHI-3 konditionierten Medien:

WEHI-3 konditionierte Medien wurden mittels Sephacryl S300<sup>R</sup> Gelfiltration fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden nach Zusatz von 0,05% BSA als 20%iger Volumenanteil mit B8/3-Zellen in 5 ml-Kulturen 4 Tage inkubiert. Anschließend wurde die relative Menge an gebildeter  $\alpha$ -Globin mRNA quantifiziert. Der Hauptgipfel in Abb. 6 lief mit der kleinemolekularen Flanke des BSA.

#### Suche nach optimalen Bedingungen der EDA Expression für Expressionsklonierung:

WEHI-3-Zellen wurden in 250 ml Flaschen in FCS-haltigem Medium bis zu verschiedenen Dichten gezogen. Der größere Teil wurde nach Erreichen der unterschiedlichen Dichten (Abb. 7) für die Präparation von mRNA geerntet, und ein kleinerer Teil wurde unter Standardbedingungen 3 Tage zur Gewinnung von WCM in serumarmem Medium weiterkultiviert. Abb. 7 zeigt, daß die angestrebten Dichten von ca.  $2,5 \times 10^5$  (W3/1),  $5 \times 10^5$  (W3/2) und  $8 \times 10^5$  Zellen/ml (W3/3) nach unterschiedlichen Zeiten erreicht waren. Die Zellen wurden auf einheitliche Dichte von  $1 \times 10^6$ /ml

eingestellt und in Serum-armem Medium 72 h weiterinkubiert. Die höchste EDA-Aktivität fand sich in den W3/2-Überständen (Abb. 7). Die RNA der geernteten W3/2-Zellen wurde deshalb für die Konstruktion einer Expressionsbibliothek weiterverarbeitet. Aus Abb. 7 wird auch deutlich, daß bei höheren Konzentrationen der WCM's immer auch eine Inhibition der Differenzierungsinduktion zu finden ist. Gleichzeitig findet man für diese Konzentrationen eine Inhibition der Proliferation. In Abb. 8 ist für das WCM von W3/2 gezeigt, daß die optimale Konzentration für eine Differenzierungsinduktion in B 8/3-Zellen durch WCM-Fraktionen zwischen 66 und 25 kDa bei 25% liegt. Obwohl in dieser Analyse in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Abb. 6 der Hauptpeak von EDA bei einer Molekülgröße zwischen 60 und 40 kDa gefunden wurde, zeigten andere, ähnliche Untersuchungen deutliche Aktivitäten bis herunter zu Molekülgrößen von 10 kDa. Das Vorliegen unterschiedlich großer Moleküle mit EDA-Wirkung, oder die Zusammenlagerung von einer EDA Molekülspezies in unterschiedlich großen Aggregaten, oder die Bildung von Abbauprodukten sind mögliche Erklärungen.

Beim Austesten der optimalen Kulturbedingungen von WEHI-3 Zellen für die Gewinnung hoher Aktivitäten von EDA fiel auf, daß die Art der primären Inkubation in 10% FCS von Bedeutung ist. Beim Austesten von 6 verschiedenen Batches von FCS verschiedener Hersteller war die Ausbeute an EDA-Aktivität sehr unterschiedlich. Mit dem günstigsten FCS wurden die weiteren Versuche angestellt. Weiterhin war ein wichtiger Befund, daß die Gewinnung von EDA-Aktivität nicht möglich war, wenn im zweiten Kultivierungsteil (normalerweise 72 h in serumarmem Medium mit 0,1% BSA) dasselbe Medium wie im ersten Teil mit 10% FCS verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

#### Konstruktion einer Expressionsbibliothek mit W3/2 RNA und dem Vektor pXPRS+:

Die nicht-amplifizierte Bibliothek umfaßte ca.  $5 \times 10^5$  Klone. Nach Amplifikation und Größenselektion (Inserts >600 bp) wurden je ca. 500 Klone auf einen runden Hybond-N<sup>R</sup>-Filter von 14

cm Durchmesser auf LB-Agar plattiert. Die Klone wurden durch Filterabklatsch auf einem 2. Filter zur Isolierung der Plasmid DNA gezogen. Nach Transfektion dieser DNA in Cos-1 Zellen wurde der Cos-1 Überstand im Ansatz mit B 8/3 Zellen getestet. Das Entscheidungskriterium war der prozentuale Anteil Benzydin-positiver Zellen nach 3 - 5 Tagen. Insgesamt wurden auf diese Weise 25.000 Klone gescreent. In der Serie D ergab sich ein positives Signal (Abb. 9). Die 520 Klone der Serie D wurden in Gruppen von je ca. 25 unterteilt und erneut getestet (Serie D15). Darauf erfolgte ein Schritt mit je ca. 10 Klonen (Serie DX), und schließlich wurde jeder Klon der letzten 10 einzeln getestet (Serie DY). Der Klon DY-8 hatte eine um 1-2 Verdünnungsstufen geringere Aktivität als die positive WCM-Kontrolle. Die DNA dieses Klon wurde gereinigt und in 3 unabhängigen Versuchen transient in Cos-1 Zellen transfiziert. Es ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Differenzierungsinduktion durch die Überstände der mit DY-8 transfizierten Zellen zu der Differenzierungsinduktion, die durch Kontrollüberstände nach Transfektion mit demselben Vektor, aber einem irrelevanten Insert gleicher Größe erreicht wurde (Abb. 10).

Radioaktives Screenen der pXPRS+ Bibliothek mit dem Klon DY-8:

Der Klon DY-8 zeigte einen Größenbereich von ca. 950-750 bp, da statt einer scharfen Bande ein Schmier über ca. 200 bp vorhanden war. Wegen des Verdachts eines unvollständigen Klon wurde die Genbibliothek mit DY-8 als Sonde radioaktiv gescreent. Insgesamt wurden 32 positive Klone erhalten, wobei der größte ca. 1.350 bp betrug. Dieser Klon erhielt die Bezeichnung HA-15/2. Er zeigte eine schwache Differenzierungsinduzierende Wirkung, für die in 3 Versuchen allerdings keine statistische Signifikanz erreicht wurde (Abb. 11). Wegen seiner Größe diente er bei den weiteren Detektionensarbeiten durch Hybridisierung (Southern Blot, Northern Blot, weiteres Screenen einer anderen Genbibliothek) als radioaktive Sonde, auch wenn anzunehmen war, daß es sich um einen unvollständigen Klon handelte.

Anlegen einer cDNA-Bibliothek in Lambda-Phagen:

Unter der Annahme, daß die stärkste Aktivität von eda von einer 2,2 kbp großen mRNA-Spezies herrühre, die besonders stark in NIH-3T3 Zellen exprimiert wird (s. u.), wurde cDNA aus NIH-3T3 poly(A)+ mRNA umgeschrieben und auf einem nicht-denaturierenden Gel nach Größen getrennt. Der Bereich von 1.900 bis 2.500 bp wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und in Lambda Zap II<sup>R</sup>-Phagen einkloniert. Alle eda Klone, die mit diesem Verfahren erhalten wurden, waren jedoch kleiner als 1.500 bp.

Southern Blot Analysen:

Analysen von genomischer DNA aus der Milz von C3H-Mäusen zeigten bei Hybridisierung mit der 1.350 bp großen Sonde HA-15/2 (BamHI-Fragment), insbesondere nach Verdau der DNA mit SacI, 4 Banden von 6,5, 5,7, 3,8 und 2,1 kbp. Mit EcoRI ergaben sich in der DNA von WEHI-3 Zellen 2 schwache Banden bei 7,5 und 5,5 kbp. Wichtig war die Beobachtung, daß auch menschliche genomische DNA, gewonnen aus der Zelllinie K562, nach EcoRI-Verdau eine Bande bei 7,5 kbp sowie eine weitere bei 6,5 kbp aufwies (Abb. 12). Da die Waschbedingungen hochstringent gewesen waren (bis 2 x 30 min 0,1 x SSC / 0,1% SDS bei 60°C), dürften das murine und das menschliche Gen einige Homologie aufweisen. Die Möglichkeit, das menschliche eda-Gen mit einer murinen radioaktiven Sonde aus einer Genbibliothek zu gewinnen, ist durch Abb. 12 belegt.

Untersuchungen der eda-Genexpression:

Die Untersuchungen wurden mit dem ca. 1.350 bp großen BamHI-Fragment von HA-15/2 als Sonde durchgeführt. Im Northern Blot finden sich bei stringenter Waschung (bis 20 min 0,1 x SSC / 0,1% SDS und 60°C) eine Reihe unterschiedlich großer und unterschiedlich stark hybridisierender Banden (Abb. 13). Einzelne Banden, die größer als 5 kbp sind, sind von Zellart zu Zellart unterschiedlich (s. u.). Die im allgemeinen stärkste Bande liegt bei 2.200 bp, weitere Banden finden sich in unterschiedlich starker Ausprägung bei 1.750 bp, 1.350 bp und 1.200



bp. Abb. 13 zeigt, daß alle Banden mit der gesamten Probe (BamHI-Fragment von HA-15/2) genauso gut hybridisieren wie mit den 500 3'-Basenpaare dieser Probe, daß dagegen die 200 Basenpaare am 5'-Ende dieser Probe nur mit den großen Banden über 5.000 bp und mit der 2.200 bp Bande ein erkennbares Signal ergeben. Daraus ist zu schließen, daß die großen Banden zumindest Anteile von allen kleineren Banden enthalten, daß die 2.200 bp Bande, sowie die Banden > 2.200 bp den 5'-Teil der Probe in detektierbarem Umfang enthalten, während der 3'-Teil der Probe in allen Banden gemeinsam vorkommt. Bei einer Untersuchung von verschiedenen Mausstämmen wegen der Unterschiedlichkeit der Banden in den 2 Zellarten NIH-3T3 und M2-10B4 (Abb. 12) ergab sich, daß innerhalb eines Stammes in den verschiedenen Geweben alle Banden identisch sind, daß die Banden aber von Mausstamm zu Mausstamm variieren. NIH-3T3 Zellen sind Fibroblasten, die sich von Swiss-Mäusen ableiten, während die Knochenmarkfibroblasten der Linie M2-10B4 von B6C3F<sub>1</sub> Mäusen abstammen (Lemoine et al., 1988). Analog findet man auf genomischer DNA-Ebene zahlreiche Restriktionsunterschiede zwischen den einzelnen Mausstämmen (Daten nicht gezeigt).

#### Expressionsmuster von eda in Geweben der normalen Maus:

An C3H-Mäusen wurde das Expressionsmuster der verschiedenen Gewebe geprüft. Die stärkste Expression fand sich im normalen Thymus (adult und foetal (d.15) etwa gleich) und in der foetalen Leber (d. 15). Es folgte in der Expressionsstärke die Milz, und deutlich schwächer war die Expression im normalen Knochenmark. Eine ganz schwache Expression, teilweise nur auf poly(A)+ Ebene detektierbar, fand sich in allen untersuchten Organen und Geweben wie Leber, Niere, Darm, Hirn und Plazenta. Primäre Mastzellen dagegen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden durch 4-wöchige Kultivierung des Knochenmarks mit IL-3, waren stärker positiv als normale Milzzellen.

#### Expressionsmuster in murinen Zelllinien:

Die Expressionsstärke in den Zelllinien war sehr unterschiedlich, im allgemeinen aber stärker als in den primären Geweben.

Unter den nicht-malignen Zellen zeigte die embryonale Fibroblastenlinie NIH-3T3 eine starke Expression, während die Fibroblastenlinie L929 fast keine Expression aufwies. Eine Mittelstellung nahm die Knochenmarkfibroblastenlinie M2-10B4 ein. Eine sehr starke Expression fand sich in der T-Helferzelllinie TS1-C3, während die Thymom-Zelllinie EL-4 fast keine Expression aufwies. Die myeloischen Zelllinien FDCP-1 und 32DC123 sowie die Mastzelllinie 138-8A zeigten nur eine schwache Expression. Die aus murinen malignen hämopoetischen Geweben etablierten Zelllinien zeigten im allgemeinen eine starke bis sehr starke Expression. Dieses wurde bei den WEHI-3-Zellen, bei DA-3, NFS-60 und NFS-61 (alle Zelllinien stammen von murinen Leukämien ab) deutlich.

#### Expressionsmuster in humanen Zellen:

Mit HA-15/2 als radioaktiver Sonde gelingt es, wenn auch mit erheblichem Background, eine Expression von eda in menschlichen Zellen nachzuweisen. Der Background bezieht sich auf eine starke Mithybridisierung von 28S ribosomaler RNA, so daß stringent bis 20 min 0,2 x SSC/0,1% SDS bei 60°C gewaschen werden muß, um die entscheidenden Banden zu erkennen. Insbesondere in der poly(A)+ RNA von Jurkat-Zellen fanden wir ein Transcript bei 2,5 kbp, und auch in der Gesamt-RNA von K562 Zellen sieht man schwach eine solche Bande (Abb. 14). Von den niedermolekularen eda mRNA-Spezies wurde bislang nur in einem Fall einer T-CLL eine distinkte Bande bei 1.100 - 1.200 bp unter Verwendung der murinen Sonde gefunden (Daten nicht gezeigt).

#### Untersuchungen der eda mRNA Expression in murinen Milzzellen:

Milzzellen verlieren bei in vitro-Inkubation ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI 1640 mit 10% FCS und den üblichen Zusätzen) innerhalb weniger Stunden ihre eda Expression. Bei Zugabe von Anti-T-Zellrezeptor-Antikörper oder Concanavalin A (Abb. 15), oder auch von TPA, kommt es innerhalb von 1 Stunde zu einer leichten Verstärkung der 2,2 kbp Bande sowie der größeren Banden, nach 4 Stunden sind diese Transkripte aber bereits wieder ver-

mindert, und es herrscht eine Akkumulation von eda Abbauprodukten definierter Größen (<400bp) ohne Stabilisierung der normalen Transkripte vor. Innerhalb von 24-28 Stunden klingen diese Effekte weitgehend ab.

Eine Stabilisierung der eda mRNA in Milzzellen in vitro wurde dagegen erreicht, wenn eine 3-tägige gemischte Milzzell-Reaktion mit je  $1 \times 10^6$  unbestrahlten und unbehandelten CBA- und CBL-Zellen/ml durchgeführt wurde (Abb. 16). Waren die CBA-Milzzellen dagegen zuvor mit 15 Gy bestrahlt worden, trat wiederum keine Stabilisierung der mRNA ein, ebensowenig, wie wenn CBL Milzzellen alleine in vitro kultiviert wurden.

Die Beteiligung von eda an der allogenen Reaktion, interessanterweise nur bei Stimulation durch unbestrahlte Zellen (Abb. 16), wurde in einem in vivo Modell der akuten Graft versus Host (GvH)-Erkrankung bestätigt. Wenn (CBA x CBL)  $F_1$ -Hybriden nach 9 Gy Ganzkörper-Bestrahlung  $5 \times 10^7$  CBL Milzzellen injiziert werden, entwickelt sich eine schwere GvH-Erkrankung. Im Rahmen dieser Erkrankung fanden wir am 6. Tag nach der Transplantation in der Milz der Empfängertiere einen ca. 7-fachen Anstieg der eda-Expression im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen die eda-Expression abfiel (Abb. 17). Diese Reaktion war auf die Milz beschränkt, wahrscheinlich, weil in den anderen untersuchten Organen der prozentuale Anteil der an der GvH-Erkrankung beteiligten Entzündungszellen, bezogen auf alle Zellen, zu gering war, um einer Erhöhung der eda-Expression im Northern Blot sichtbar zu machen.

#### Sequenzanalysen von eda:

Die DNA-Sequenz von eda, bzw. von den verschiedenen cDNA Spezies, erwies sich als schwierig analysierbar, insbesondere wegen zahlreicher Repeat-Strukturen sowie AT- und GC-reicher Abschnitte. Aus verschiedenen Klonen der pXPRS<sup>R</sup> und Lambda Zap II<sup>R</sup> Bibliotheken wurde eine Konsensus-Sequenz abgeleitet (Abb. 18), die am ehesten ein Teil der 2,2 kbp cDNA sein dürfte. Abb. 19 zeigt die anzunehmende Struktur der 2,2 kbp Sequenz,

die noch nicht vollkommen analysiert werden konnte. Drei verschiedene Typen von Repeats sind durch die Bezeichnung R1, R2 und R3 kenntlich gemacht. Die mit dicken Strichen gekennzeichneten Abschnitte sind von ihrer relativen Zuordnung her gesichert. Nicht gesichert ist jedoch, ob die noch fehlenden ca. 300 bp im Anfangsteil der Sequenz liegen, wie in Abb. 19 angedeutet, oder ob noch ein weiterer Repeat bereits bekannter Sequenz vorliegt. Ein offener Leserahmen wurde nicht gefunden, wobei die zahlreichen Stopcodons (durch \* kenntlich gemacht), bevorzugt in den Anfangscodons der Repeats liegen. Sie sind in Abb. 19 nicht vollständig wiedergegeben. Die in dieser Sequenz vorkommenden größeren Repeats sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

In Abb. 20 ist die Sequenz des DY-8 Klons in den jeweils oberen der 2 Reihen wiedergegeben. Diese Sequenz enthält einen offenen Leserahmen, der mit dem als Box eingezeichneten ATG bei Position 155 beginnt, jedoch ist die Aktivität dieses Klons bei Transfektion in Cos-Zellen nicht stark genug um anzunehmen, daß hierbei das entscheidende 5'-Ende des offenen Leserahmens vorliegt. Bei Position 74 beginnt die Konsensussequenz mit der presumptiven 2,2 kbp eda-Sequenz von Abb. 18. Nur die ersten 73 Basen sind demnach DY-8-spezifisch Sequenz. Da das 5'-Ende nicht zweifelsfrei feststeht, wurde ein längerer Leserahmen durch Einfügen eines ATG bei Position 52 (Abb. 20, untere Reihe) geschaffen, der die gesamte gemeinsame Sequenz mit der presumptiven 2,2 kbp eda-Sequenz einschließt. Er wurde als 636 bp eda im Gegensatz zu dem kürzeren offenen Leserahmen von DY-8 (534 bp eda) gekennzeichnet.

#### Transfektion von eda-Sequenzen mit Hilfe des Rc/CMV-Vektors:

Sowohl das 534 bp als auch das 636 bp eda-Fragment (s. voriges Kapitel) wurden in den Vektor Rc/CMV ligiert und in die humane Colocarcinomzelllinie CX2 stabil transfiziert. Überstände dieser Zelllinie wurden 6 Wochen nach Transfektion und permanenter G 418-Selektion unter Weglassen des Antibiotikums gewonnen und auf ihre Fähigkeit zur Differenzierungsinduktion von murinen

Erythroleukämiezellen der Linie B8/3 geprüft. Abb. 21 zeigt, daß ähnlich wie bei den in Abb. 10 wiedergegebenen Ergebnissen das 534 bp eda, das den offenen Leserahmen von Klon DY-8 enthält, eine Differenzierungs-induzierende Aktivität auf dieser Zelllinie entfaltet, die in ihrer Stärke derjenigen des WEHI-3 konditionierten Mediums der Kontrolle entspricht. Demgegenüber hat das längere transfizierte Stück (636 bp eda) eine um 1,5 - 2 Verdünnungsstufen höhere Aktivität.

Wachstumsfaktor-Eigenschaften von eda für die Zelllinie BL-70:

Die humane Zelllinie BL-70 stammt von einem EBV-negativen Burkitt Lymphom und wurde 1985 von Lenoir et al. in Kultur gebracht. Falk et al. haben diese Zelllinie 1993 eingehend untersucht und gezeigt, daß sie bis zu einer bestimmten Zelldichte nicht ohne Stromazellen wachsen kann. Oberhalb einer kritischen Zelldichte sind die Zellen aber in der Lage, frei von Stromasupport zu proliferieren. Abb. 22 zeigt, daß geringe Volumenanteile des Überstandes eines Klons der mit dem 534 bp eda transfizierten CX2-Zelllinie in der Lage sind, das Dichte-abhängige Wachstum der Kontrolle in ein Dichte-abhängiges Wachstum zu überführen.

eda-Wirkung auf CD34+ Progenitoren des menschlichen Knochenmarks:

In mehreren Versuchen wurde die Wirkung von eda-haltigem Überstand auf Progenitoren des menschlichen Knochenmarks getestet (Abb. 23). Wirkungen waren sowohl auf frühe Progenitoren (gemischte Kolonien in Abb. 23A), als auch auf reifere Progenitoren (BFU-E und GM-CFC in Abb. 24B) erkennbar. Sie bezogen sich sowohl auf das Knochenmark eines hämatologisch Gesunden, als auch auf das Knochenmark eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (Abb. 23B). Diese Wirkungen können sowohl als solche eines Wachstumsfaktors, als auch als solche eines Überlebensfaktors interpretiert werden.

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß die Qualität des bereitgestellten Proteins, d.h. dessen Aktivitäten, insbesondere

vom 3'-Ende der für das Protein kodierenden Nukleotidsequenz abhängt, während die Quantität der Expression des Proteins vom 5'-Ende beeinflußt wird.

Wie vorstehend gezeigt wurde, war das 5'-Ende nicht genau bestimmbar. Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse ist es für den Fachmann aber ohne weiteres möglich, das 5'-Ende bzw. die 5'-Enden zu bestimmen bzw. so auszuwählen, daß eine quantitativ höhere Expression ermöglicht wird.

Die Erfindung umfaßt sämtliche Proteine mit den beschriebenen Eigenschaften, gleichgültig, ob sie in tierischen oder menschlichen Zellen vorkommen. Die dargestellten DNA und Aminosäuresequenzen sind teilweise Consensussequenzen, d.h. aus mehreren Sequenzen wurde diejenige Sequenz erstellt, die einen durchgehenden Leserahmen ergibt. Es ist nicht auszuschließen, daß das native Protein sich von dem durch die Consensussequenz kodierten Polypeptid unterscheidet.

Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung kennzeichnet das Protein durch 8 verschiedene Merkmale a) bis h). Das erfindungsgemäß bereitgestellte Protein muß zumindest die Merkmale a), c) und d) erfüllen. In bevorzugten Ausgestaltungen der Erfindung werden zumindest eines oder mehrere der weiteren Merkmale erfüllt.

Tabelle 1: Prozentuale Verminderungen der EDA-Aktivität

1.	Trypsin Verdau: 50 µg/ml 30 min 37°C:	75,7%
2.	Spaltung von Disulfid-Bindungen: 50 mM DTT, 2 h bei Raumtemperatur:	98,5%
3.	Hitzeinaktivierung: 60°C, 20 min:	0 %
4.	Hitzeinaktivierung: 80°C, 20 min:	61,7%
5.	Gefrieren und Auftauen (5 Zyklen):	37,1%

Tabelle 2: Zytokine ohne Differenzierungs-induzierende Wirkung auf Maus  
Erythroleukämiezellen

Zytokin	getestete Zellen	Methode	Ergebnis
Epo	F4N	Benzidin	neg.
IL-3	F4N	Benzidin	neg.
IL-6	F4N, B8/3	$\alpha$ -Globin mRNA	neg.
LIF	F4N, B8/3	$\alpha$ -Globin mRNA	neg.
TNF- $\alpha$	F4N, B8/3	$\alpha$ -Globin mRNA	neg.
TGF- $\beta$	F4N, B8/3	$\alpha$ -Globin mRNA	neg.
Kit Ligand	B8/3	Benzidin	neg.

Tabelle 3: Repeatstrukturen in der presumptiven Konsensus-Teilsequenz der 2.200 bp *eda* cDNA

1. 42 bp Repeat

855 CGTCCGCCGG TCACGGCCGC CGCCCCCAGC GACGTCACCC AC

Wiederholung von 1248 - 1289

2. 55 bp Repeat

903 AGAAGCGGAC GCCGCGGTCA AGATGTCTCT GCCATGCCCA CGGGACGCAC  
953 GGACG

Wiederholung von 1304 - 1358

3. 81 bp Repeat

163 TAGTCCTGCC GTCGTCAATG GTTCTCTATG GGCTTTCAGA GTGAGTGGCG  
213 GGAAGGCGGC CCCGAGGCAT GCTGGGAGTT G

Wiederholungen von 82 - 162; und von 244 - 324

4. 178 - 180 bp Repeat

348 GTTCTCTGT ATAGACCTGG CTGTGGATTT TTCGCTAATT CTTTTTTTTTA  
398 GCTTTATTTT TAATTTTTTAC TTTTTCACAC AGGATTTCCTC TTTATAGCCT  
448 TGGCTACCGT TTTTTCCTTA ATTATTCTCC TTTTCATTTT GGTTTATTTT  
498 TTTTAAATT TGGTTTTTTT AAGACAGG

Wiederholung von 526 - 705

5. 385 bp Repeat

1001 GACCGCACCG CCGCACCCAC CACAGCACAC AGGACACACG CGGGCCCCGC  
1051 GCCCGCCCAG GCACACGCGG CACACACGGC ACACACGGCA GGCAGGCCAG  
1101 GCACACGCAT CCGCAGGACC CGCCGCACCC GCCACGCAGA CACGGACGAG  
1151 CCGCCGCGGT CAAGATGTTT ACCCGCCGCG GTCAAGATGT ATGTGCCACC  
1201 GACCCTCGCC CCGCTGGACG GACGGACGGA CGCACGCACG CCGTCAGCGT  
1251 CCACCGGTCA CTGCCGCCGC CCACAGTGAT GTCACCCACG AAAGCACACA  
1301 CGTAGAAGCG GACGCCGTGG TCAAGATGTC TCTGCCATCC CCACAGGACG  
1351 GACGGACGGA CTCCACAAGG T

Wiederholung nur in einzelnen Klonen, nicht in der Konsensus-Teilsequenz



## .HEADLINE

ATCC CCL-243

K-562 (Chronic myelogenous leukemia, human)

## .TEXT

Current medium for propagation: RPMI 1640, 90%; FBS, 10%. The continuous cell line K-562 was established by Lozzio and Lozzio (Blood 45: 321-334, 1975) from the pleural effusion of a 53-year-old female with chronic myelogenous leukemia in terminal blast crises. The cell population has been characterized as highly undifferentiated and of the granulocytic series (Leukemia Res. 3: 363-370, 1979). Studies conducted by Anderson, et al., (Int. J. Cancer 23: 143-147, 1979) on the surface membrane properties led to the conclusion that the K-562 was a human erythroleukemia line. The effect of inducers on sublines derived from the original K-562 cell line have been reviewed by Koeffler and Golde (Blood 56: 344-350, 1980). More recent studies indicate that the K-562 blasts are multipotential, hematopoietic malignant cells that spontaneously differentiate into recognizable progenitors of the erythrocytic, granulocytic and monocytic series (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166: 546-550, 1981). The K-562 cell line has attained widespread use as a highly sensitive in vitro target for the natural killer assay (J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 59: 77-83, 1977). Cultures from the ATCC stock have been shown to exhibit this sensitivity for assessing human natural killer activity.

Karyological studies on various K-562 sublines have been classified into three groups (A,B,C) by Dimery, et al., (Exp. Hematol. 11: 601-610, 1983). The strain obtained by the ATCC most closely resembles the B population. Occurrence of the Philadelphia chromosome, however, was of much lower frequency; none detected in 15 metaphases examined.

## DESCRIPTION OF REPOSITORY REFERENCE SEED STOCK

Number of Serial Subcultures from Tissue of Origin: Unknown.

Freeze Medium: Culture medium, 95%; dimethyl sulfoxide (DMSO), 5%; antibiotic-free.

Viability: Approximately 85% (dye exclusion).

Culture Medium: RPMI medium 1640, 90%; FBS, 10%; antibiotic-free.

Growth Characteristics of Thawed Cells: An inoculum of  $1-2 \times 10^5$  viable cells/ml in the above culture medium at 37C results in a doubling time of 26-30 hrs over a 5- to 7-day period provided fresh medium is added at 48-72 hr intervals.

Plating Efficiency: The cells cannot be plated.

Morphology: Lymphoblast-like.

Karyology: Chromosome Frequency Distribution 50 Cells:  $2n = 46$ 

ells: 1 1 10 12 7 13 3 2 1

Chromosomes: 64 65 66 67 68 69 70 72 77

The stemline chromosome number is triploid with the 2S component occurring at 4.2%. Fifteen markers (M1 and M(15)) occurred in nearly all S metaphases. Spontaneous non-specific dicentrics occurred, but rarely. Unstable markers were also rarely seen. The X was disomic, and N9 was nullisomic.

Sterility: Tests for mycoplasma, bacteria, fungi, protozoa and viruses were negative.

Species: Confirmed as human by isoenzymology.

Tumorigenicity: Tumors developed in 30-35 days at 33 1/3% frequency (2/6) in nude mice inoculated subcutaneously with 10(7) cells.

EBNA: Negative.

Reverse Transcriptase: Not detected.

Erythrocyte Rosette Test: E, 1%; EA, 34%; EAC, 2%.

HLA Profile: Not detected.

Isoenzymes: AK1, 1; ES D, 1; GLO-1, 2; G6PD, B; PGM1, 0; PGM3, 1; Me-2, 0.

Submitted by: H.T. Holden, NCI, NIH, Bethesda, MD.

Prepared and characterized by: ATCC, Rockville, MD.

Price Code: J

## .HEADLINE

ATCC TIB-68

WEHI-3 (Myelomonocyte, mouse)

## .TEXT

Passage Frozen: Unknown. Current medium for propagation: Iscove's modified Dulbecco's medium with 2-mercaptoethanol,  $10^{-5}$ M, 90%; FBS, 10%. Additional Information: This macrophage-like line was derived from a BALB/c mouse. Growth of these myelomonocytic leukemia cells is inhibited by concentrations of LPS as low as 4.0 ng/ml and blocked completely at higher concentrations. Dextran sulfate also inhibits growth at concentrations of 30-40 mcg/ml. Production of the constitutive enzyme lysozyme and of granulocyte colony-stimulating activity (CSA) by WEHI-3 is unaffected or actually enhanced during inhibition of cell growth. Latex beads are phagocytized but not toxic. Zymosan and BCG are also phagocytized and block growth. The cell surface bears receptors for immunoglobulin and complement. WEHI-3 exhibits only weak effector activity against sheep erythrocytes or the tumor target EL-4 in an antibody-dependent cell mediated cytotoxic system. References: Cancer Res. 37: 546-550, 1977; J. Immunol. 119: 950-954, 1977; J. Exp. Med. 143: 1528-1533, 1976; *ibid.*, 154: 1419-1431, 1981. Submitted by: Laboratory of M. Cohn, Salk Institute, La Jolla, CA.

Price Code: J

DUPLIKAT

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

## INTERNATIONALES FORMBLATT

GSF-Institut für  
Experimentelle Hämatologie  
Marchioninstr. 25  
8000 München 70

DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen  
und Zellkulturen GmbH

*U. W. 11.02.92*

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: GSF-Institut für Experimentelle Hämatologie Adresse: Marchioninstr. 25 8000 München 70	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER:  DSM ACC2056  Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung <sup>1</sup> : 1993-01-27
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1993-01-27 <sup>2</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> lebensfähig <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST <sup>4</sup>	
IV. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschrift: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  <i>Dagmar Tüch</i> Datum: 1993-02-12

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.

<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

**DUPLIKAT**

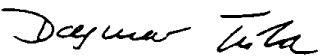
**BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN**

INTERNATIONALES FORMBLATT

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen  
und Zellkulturen GmbH. 11.02.

GSF-Institut für  
Experimentelle Hämatologie  
Marchioninistr. 25  
8000 München 70

**EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,**  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
**INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE**

<b>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>	
Vom HINTERLEGER zugeordnetes Bezugszeichen:  L8815	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeordnete EINGANGSNUMMER:  DSM ACC2056
<b>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</b>	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde  (     ) eine wissenschaftliche Beschreibung ( X ) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung  eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
<b>III. EINGANG UND ANNAHME</b>	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1993-01-27 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
<b>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</b>	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am                                       eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
<b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>	
Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Adresse: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihm ermächtigten Bediensteten:   Datum: 1993-02-12

1 Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist  
Formblatt DSM-BP/4 (einsige Seite) 0201

## Literatur

Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159 (1987)

Cullen BR: Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes., pp 684-704. In: Methods in enzymology, vol. 152: Guide to molecular cloning techniques (eds. Berger SL, Kimmel AR), Academic Press, New York, 1987

Dexter TM, Garland J, Scott D, Scolnick E, Metcalf D: Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. J. Exp. Med. 152, 1036 (1980)

Dube SK, Pragnell IB, Kluge N, Gaedicke G, Steinheider G, Ostertag W: Induction of endogenous and of spleen focus-forming viruses during dimethylsulfoxide-induced differentiation of mouse erythroleukemia cells transformed by spleen focus-forming virus. Proc Nat. Acad. Sci. USA 72, 1863-1867 (1975)

Falk MH, Hültner L, Milner A, Gregory CD, Bornkamm GW: Irradiated fibroblasts protect Burkitt lymphoma cells from apoptosis by a mechanism independent of BCL-2. Int. J. Cancer 55, 485-491 (1993)

Farrar JJ, Howard M, Fuller-Farrar J, Paul WE: Biochemical and physiochemical characterization of mouse B cell growth factor: a lymphokine distinct from interleukin 2. J. Immunol. 131, 1838-1842 (1983)

Greenberger JS, Eckner RJ, Sakakeeny M, Marks p, Reid D, Nabel D, Hapel A, Ihle JN, Humphries C: Interleukin 3-dependent hemopoietic progenitor cell lines. Fed. Proc. 42, 2762 (1983)

Guilbert LJ, Iscove NN: Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature* 263, 594-595 (1976)

Hanahan D: Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580 (1983)

Holmes KL, Palaszynski E, Frederickson TN, Morse III HC, Ihle JN: Correlation of cell-surface phenotype with the establishment of interleukin 3-dependent cell lines from wild-mouse murine leukemia virus-induced neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6687-6691 (1985)

Hültner L, Moeller J, Schmitt E, Jäger G, Reisbach G, Ring J, Dörmer P: Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth enhancing activity different from both IL-3 and IL-4. *J. Immunol.* 142, 3340-3446 (1989)

Ihle JN, Rein A, Mural R: Immunological and virological mechanisms in retrovirus induced murine leukemogenesis. In: *Advances in viral oncology*, vol. 4 (G Klein, ed.), 95-137, Raven Press, New York 1984

Inoue H, Nojima H, Okayama H: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28 (1990)

Lemoine FM, Humphries RK, Abraham SDM, Krystal G, Eaves CJ: Partial characterization of a novel stromal cell-derived pre-B cell growth factor active on normal and immortalized pre-B cells. *Exp. Hematol.* 16, 718- (1988)

Lenoir GM, Vuillaume M, Bonnardel C: The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *IARC Sci. Publ.* 59, 309-318 (1985)

Lozzio CB, Lozzio BB: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood 45, 321-334 (1975)

Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods 65, 55-63 (1983)

Okayama H, Berg P: High-efficiency cloning of full-length cDNA. Mol. Cell. Biol. 2, 161-170 (1982)

Ostertag W, Melderis H, Steinheider G, Kluge N, Dube S: Synthesis of mouse haemoglobin and globin mRNA in leukaemic cell cultures. Nature New Biol. 239, 231-234 (1972)

Ostertag W, Crozier T, Kluge N, Melderis H, Dube S: Action of 5-bromodeoxyuridine on the induction of haemoglobin synthesis in mouse leukaemia cells resistant to 5-BUdR. Nature New Biol. 243, 203-205 (1973)

Ostertag W, Roesler G, Krieg CJ, Kind J, Cole T, Crozier T, Gaedicke G, Steinheider G, Kluge N, Dube S: Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4980-4985 (1974)

Ovejera AA, Houchens DP, Catane R, Sheridan MA, Muggia FM: Efficacy of 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine and N-[N- $\gamma$ -Glutamyl-6-diazo-5-oxo-norleucinyl]-6-diazo-5-oxo-norleucine against experimental tumors in conventional and nude mice. Cancer Res. 39, 3220-3224 (1979)

Pruitt SC: Expression vectors permitting cDNA cloning and enrichment for specific sequences by hybridization/selection. Gene 66, 121-134 (1988)



Rosenfeld C, Venuat AM, Goutner A, Guégang J, Choquet C, Tron F, Pico JL: An exceptional cell line established from a patient with acute lymphoid leukemia. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 16, 1075 (1975)

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning. A laboratory manual. Second edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5471 (1977)

Takaue Y, Reading CL, Roome AJ, Dicke KA, Tindle S, Chandran M, Devaraj B: Limiting-dilution analysis of the effects of colony-stimulation factors, phytohemagglutinin, and hydrocortisone on hematopoietic progenitor cell growth. Blood 70, 1611-1618 (1987)

Thalmeier K, Meißner P, Reisbach G, Falk M, Brechtel A, Dörmer P: Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. Blood 83, 1799-1807 (1994)

Uyttenhove C, Simpson RJ, Van Snick J: Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6934-6938 (1988)

Warner NL, Moore MAS, Metcalf D: A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB/c mice: cytology, karyotype and muramidase content. J. Natl. Cancer Inst. 43, 963 (1979)

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: GSF Forschungszentrum fuer Umwelt und  
Gesundheit GmbH
- (B) STRASSE: Ingolstaedter Landstr. 1
- (C) ORT: Oberschleissheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 85764

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neues Protein mit  
differenzierungsinduzierender Aktivitaet

## (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1495 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

## (iii) HYPOTHETISCH: JA

## (iv) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mus musculus

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
CCGACCGTGC GGACTTAAGA TGGAGGCACT TCCTGTCTGC GCGGGAAGA GAAGGCTCGG      60
TCGGAGCCGG GAATGCTGGG ACTTGTAGTG CGTAGTCAAT GGTCTCTAT GGGCTTTCAG      120
```

AGTGAGTGGC GGAAGGCGG CCCCAGGCA TGCTGGGAGT TGTAGTCCTG CCGTCGTCAA	180
TGGTTCTCTA TGGGCTTTCA GAGTGAGTGG CGGGAAGGCG GCCCGAGGC ATGCTGGGAG	240
TTGTAGTCCT GCCATAGTCA ATGGTTCTCT ATGGGCTTTC AGACTGAGTG GCGGGAAGGC	300
GGCCCCGAGG CATGCTGGGA GTTGCAGCGC CATGTTTTAA AGCACGCGTT TCTCTGTATA	360
GACCTGGCTG TGGATTTTTTC GCTAATTCTT TTTTTTAGCT TTATTTTTAA TTTTACTTT	420
TTCACACAGG ATTTCTCTTT ATAGCCTTGG CTACCGTTTT TTCCCTAATT ATTCTCCTTT	480
TCATTTTGGT TTATTTTTTT TTAATTTTGG TTTTTTTAAG ACAGGGTTTC TCTGTATAGA	540
CCTGGCTGTG GATTTCTCAC TAATTATTTT TTTTAGCTTT ATTTTAAATT TTTACTTTTT	600
CACACAGGAT TTCTCTTTAT AGCCTTGGCT ACCGTTTTTT CCGTAATTAT TCTTATTTTC	660
ATTTTGTTTT ATTTTTTAAT TTTAATTTTT GATTTTGGAG ACAGGGTTTC TCTTTTAGCC	720
GCAGCTATGG TTTCTGCCCT AATTATTCTT GTCCTTATTT GTAATTTAAT TCTTAATTTA	780
ATTTAATTTA TAATTTTGTT GTAAGTTTTT CTGTGGGCGT GAATGGAAAG TCTAACCCGT	840
GTTTCTCTGT TCAGCGTCCG CCGGTCACGG CCGCCGCCCC CAGCGACGTC ACCCACACGC	900
GCAGAAGCGG ACGCCGCGGT CAAGATGTCT CTGCCATGCC CACGGGACGC ACGGACGCAC	960
GGACGGACGG ACGGACTCCA CAAGGTAGGA AGCCTGCGCC GACCGACCG CCGCACCCAC	1020
CACAGCACAC AGGACACAG CGGGCCCCGC GCCCGCCCAG GCACACGCGG CACACACGGC	1080
ACACACGGCA GGCAGGCCAG GCACACGCAT CCGCAGGACC CGCCGCACCC GCCACGCAGA	1140
CACGGACGAG CCGCCGCGGT CAAGATGTTC ACCCGCCGCG GTCAAGATGT ATGTGCCACC	1200
GACCCTCGCC CCGCTGGACG GACGGACGGA CGCACGCACG CCGTCAGCGT CCACCGGTCA	1260
CTGCCGCCGC CCACAGTGAT GTCACCCACG AAAGCACACA CGTAGAAGCG GACGCCGTGG	1320
TCAAGATGTC TCTGCCATCC CCACAGGACG GACGGACGGA CTCCACAAGG TGCGCGTGTC	1380
GCCGAGGCCG CCAGGACGGA GCGATTCTCA CGGAGGAAGG AGCACGCCAA CAGGGCCTGA	1440
CTGCGTACAG ACATGTCCCC CTCAATAAAA TTGCAGTTGA AATGGAAAAA AAAAA	1495

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 715 Basenpaare

- (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 (B) LAGE: 155..688

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CGCGCCCGCC CGGGATCCCC AGCTGCCGCC GCGCCCGCCC GCCCGCCCGG GGCCCCCGCT	60
GCAGAACCGT GACCGTCCGC CGGTCACGGC CGCCGCCCCC AGCGACGTCA CCCACACGCG	120
CAGAAGCGGA CGCCGCGGTC AAGATGTCTC TGCC ATG CCC ACG GGA CGC ACG	172
Met Pro Thr Gly Arg Thr	
1 5	
GAC GCA CGG ACG GAC GGA CTG ACT CCA CAA GGT AGG AAG CCT GCG CCG	220
Asp Ala Arg Thr Asp Gly Leu Thr Pro Gln Gly Arg Lys Pro Ala Pro	
10 15 20	
ACC GCA CCG CCG CAC CCA CCA CAG CAC ACA GGA CAC ACG CGG GCC CCG	268
Thr Ala Pro Pro His Pro Pro Gln His Thr Gly His Thr Arg Ala Pro	
25 30 35	
CGC CCG CCC AGG CAC ACG CGG CAC ACA CGG CAC ACA CGG CAG GCA GGC	316
Arg Pro Pro Arg His Thr Arg His Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Gly	
40 45 50	
CAG GCA CAC GCA TCC GCA GGA CCC GCC GCA CCC GCC ACG CAG ACA CGG	364
Gln Ala His Ala Ser Ala Gly Pro Ala Ala Pro Ala Thr Gln Thr Arg	
55 60 65 70	
ACG AGC CGC CGC GGT CAA GAT GTT CAC CCG CCG CGG TCA AGA TGT ATG	412
Thr Ser Arg Arg Gly Gln Asp Val His Pro Pro Arg Ser Arg Cys Met	
75 80 85	
TGC CAC CGA CCC TCG CCC CGC TGG ACG GAC GGA CGG ACG CGC GCA CGC	460
Cys His Arg Pro Ser Pro Arg Trp Thr Asp Gly Arg Thr Arg Ala Arg	
90 95 100	
CGT CAG CGT CCA CCG GTC ACT GCC GCC GCC CAC AGT GAC GTC ACC CAC	508
Arg Gln Arg Pro Pro Val Thr Ala Ala Ala His Ser Asp Val Thr His	

105	110	115	
GAA AGC ACA CAC GTA GAA GCG GAC GCC GTG GTC AAG ATG TCT CTG CCA			556
Glu Ser Thr His Val Glu Ala Asp Ala Val Val Lys Met Ser Leu Pro			
120	125	130	
TCC CCA CAG GAC GGA CGG ACG GAC TCC ACA AGG TGC GCG TGT CGC CGA			604
Ser Pro Gln Asp Gly Arg Thr Asp Ser Thr Arg Cys Ala Cys Arg Arg			
135	140	145	150
GGC CGC CAG GAT GGA GCG ATT CTC ACG GAG GAA GGA GCA CGC CAA CAG			652
Gly Arg Gln Asp Gly Ala Ile Leu Thr Glu Glu Gly Ala Arg Gln Gln			
155	160	165	
GGC CTG ACT GCG TAC AGA AAT GCC CCC CCT CAA TAA AATTGCAGTT			698
Gly Leu Thr Ala Tyr Arg Asn Ala Pro Pro Gln *			
170	175		
GAAATGGAAA AAAAAAA			715

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 178 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met	Pro	Thr	Gly	Arg	Thr	Asp	Ala	Arg	Thr	Asp	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln
1				5					10					15	
Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	His	Pro	Pro	Gln	His	Thr
			20					25					30		
Gly	His	Thr	Arg	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Arg	His	Thr	Arg	His	Thr	Arg
			35					40					45		
His	Thr	Arg	Gln	Ala	Gly	Gln	Ala	His	Ala	Ser	Ala	Gly	Pro	Ala	Ala
	50					55						60			
Pro	Ala	Thr	Gln	Thr	Arg	Thr	Ser	Arg	Arg	Gly	Gln	Asp	Val	His	Pro
	65					70				75				80	
Pro	Arg	Ser	Arg	Cys	Met	Cys	His	Arg	Pro	Ser	Pro	Arg	Trp	Thr	Asp
				85					90					95	
Gly	Arg	Thr	Arg	Ala	Arg	Arg	Gln	Arg	Pro	Pro	Val	Thr	Ala	Ala	Ala

100                      105                      110  
 His Ser Asp Val Thr His Glu Ser Thr His Val Glu Ala Asp Ala Val  
     115                      120                      125  
 Val Lys Met Ser Leu Pro Ser Pro Gln Asp Gly Arg Thr Asp Ser Thr  
     130                      135                      140  
 Arg Cys Ala Cys Arg Arg Gly Arg Gln Asp Gly Ala Ile Leu Thr Glu  
     145                      150                      155                      160  
 Glu Gly Ala Arg Gln Gln Gly Leu Thr Ala Tyr Arg Asn Ala Pro Pro  
                     165                      170                      175  
 Gln \*

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 636 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

## (iii) HYPOTHETISCH: JA

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..636

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATG GGG CTG CAG AAC CGT GAC CGT CCG CCG GTC ACG GCC GCC GCC CCC                      48  
 Met Gly Leu Gln Asn Arg Asp Arg Pro Pro Val Thr Ala Ala Ala Pro  
     180                      185                      190  
 AGC GAC GTC ACC CAC ACG CGC AGA AGC GGA CGC CGC GGT CAA GAT GTC                      96  
 Ser Asp Val Thr His Thr Arg Arg Ser Gly Arg Arg Gly Gln Asp Val  
     195                      200                      205                      210  
 TCT GCC ATG CCC ACG GGA CGC ACG GAC GCA CGG ACG GAC GGA CTG ACT                      144  
 Ser Ala Met Pro Thr Gly Arg Thr Asp Ala Arg Thr Asp Gly Leu Thr  
                     215                      220                      225  
 CCA CAA GGT AGG AAG CCT GCG CCG ACC GCA CCG CCG CAC CCA CCA CAG                      192

53

Pro Gln Gly Arg Lys Pro Ala Pro Thr Ala Pro Pro His Pro Pro Gln	
230 235 240	
CAC ACA GGA CAC ACG CGG GCC CCG CGC CCG CCC AGG CAC ACG CGG CAC	240
His Thr Gly His Thr Arg Ala Pro Arg Pro Pro Arg His Thr Arg His	
245 250 255	
ACA CGG CAC ACA CGG CAG GCA GGC CAG GCA CAC GCA TCC GCA GGA CCC	288
Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Gly Gln Ala His Ala Ser Ala Gly Pro	
260 265 270	
GCC GCA CCC GCC ACG CAG ACA CGG ACG AGC CGC CGC GGT CAA GAT GTT	336
Ala Ala Pro Ala Thr Gln Thr Arg Thr Ser Arg Arg Gly Gln Asp Val	
275 280 285 290	
CAC CCG CCG CGG TCA AGA TGT ATG TGC CAC CGA CCC TCG CCC CGC TGG	384
His Pro Pro Arg Ser Arg Cys Met Cys His Arg Pro Ser Pro Arg Trp	
295 300 305	
ACG GAC GGA CGG ACG CGC GCA CGC CGT CAG CGT CCA CCG GTC ACT GCC	432
Thr Asp Gly Arg Thr Arg Ala Arg Arg Gln Arg Pro Pro Val Thr Ala	
310 315 320	
GCC GCC CAC AGT GAC GTC ACC CAC GAA AGC ACA CAC GTA GAA GCG GAC	480
Ala Ala His Ser Asp Val Thr His Glu Ser Thr His Val Glu Ala Asp	
325 330 335	
GCC GTG GTC AAG ATG TCT CTG CCA TCC CCA CAG GAC GGA CGG ACG GAC	528
Ala Val Val Lys Met Ser Leu Pro Ser Pro Gln Asp Gly Arg Thr Asp	
340 345 350	
TCC ACA AGG TGC GCG TGT CGC CGA GGC CGC CAG GAT GGA GCG ATT CTC	576
Ser Thr Arg Cys Ala Cys Arg Arg Gly Arg Gln Asp Gly Ala Ile Leu	
355 360 365 370	
ACG GAG GAA GGA GCA CGC CAA CAG GGC CTG ACT GCG TAC AGA AAT GCC	624
Thr Glu Glu Gly Ala Arg Gln Gln Gly Leu Thr Ala Tyr Arg Asn Ala	
375 380 385	
CCC CCT CAA TAA	636
Pro Pro Gln *	
390	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 212 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

54

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Gly Leu Gln Asn Arg Asp Arg Pro Pro Val Thr Ala Ala Ala Pro  
 1 5 10 15

Ser Asp Val Thr His Thr Arg Arg Ser Gly Arg Arg Gly Gln Asp Val  
 20 25 30

Ser Ala Met Pro Thr Gly Arg Thr Asp Ala Arg Thr Asp Gly Leu Thr  
 35 40 45

Pro Gln Gly Arg Lys Pro Ala Pro Thr Ala Pro Pro His Pro Pro Gln  
 50 55 60

His Thr Gly His Thr Arg Ala Pro Arg Pro Pro Arg His Thr Arg His  
 65 70 75 80

Thr Arg His Thr Arg Gln Ala Gly Gln Ala His Ala Ser Ala Gly Pro  
 85 90 95

Ala Ala Pro Ala Thr Gln Thr Arg Thr Ser Arg Arg Gly Gln Asp Val  
 100 105 110

His Pro Pro Arg Ser Arg Cys Met Cys His Arg Pro Ser Pro Arg Trp  
 115 120 125

Thr Asp Gly Arg Thr Arg Ala Arg Arg Gln Arg Pro Pro Val Thr Ala  
 130 135 140

Ala Ala His Ser Asp Val Thr His Glu Ser Thr His Val Glu Ala Asp  
 145 150 155 160

Ala Val Val Lys Met Ser Leu Pro Ser Pro Gln Asp Gly Arg Thr Asp  
 165 170 175

Ser Thr Arg Cys Ala Cys Arg Arg Gly Arg Gln Asp Gly Ala Ile Leu  
 180 185 190

Thr Glu Glu Gly Ala Arg Gln Gln Gly Leu Thr Ala Tyr Arg Asn Ala  
 195 200 205

Pro Pro Gln \*  
 210

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 42 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid



55

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Mus musculus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CGTCCGCCGG TCACGGCCGC CGCCCCAGC GACGTCACCC AC

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Mus musculus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

AGAAGCGGAC GCCGCGGTCA AGATGTCTCT GCCATGCCCA CGGGACGCAC GGACG

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 81 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

56

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mus musculus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

TAGTCCTGCC GTCGTCAATG GTTCTCTATG GGCTTTCAGA GTGAGTGGCG GGAAGGCGGC 60

CCCGAGGCAT GCTGGGAGTT G 81

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 178 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mus musculus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GTTTCTCTGT ATAGACCTGG CTGTGGATTT TCGCTAATT CTTTTTTTGA GCTTTATTTT 60

TAATTTTTAC TTTTTCACAC AGGATTTCTC TTTATAGCCT TGGCTACCGT TTTTCCCTA 120

ATTATTCTCC TTTTCATTTT GGTTTATTTT TTTTAATTT TGGTTTTTTT AAGACAGG 178

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 385 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mus musculus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

AGGAAGCCTG CGCCGACCGC ACCGCCGCAC CCACCACAGC ACACAGGACA CACGCGGGCC	60
CCGCGCCCCG CCAGGCACAC GCGGCACACA CGGCACACAC GGCAGGCAGG CCAGGCACAC	120
GCATCCGCAG GACCCGCCGC ACCCGCCACG CAGACACGGA CGAGCCGCCG CGGTCAAGAT	180
GTTCACCCCG CGCGGTCAAG ATGTATGTGC CACCGACCTT CGCCCCGCTG GACGGACGGA	240
CGGACGCACG CACGCCGTCA GCGTCCACCG GTCCTGCGG CCGCCACAG TGATGTCACC	300
CACGAAAGCA CACACGTAGA AGCGGACGCC GTGGTCAAGA TGTCTCTGCC ATCCCCACAG	360
GACGGACGGA CGGACTCCAC AAGGT	385

### Patentansprüche

1. Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien mit den nachfolgenden Eigenschaften, wobei zumindest die Merkmale a), b), c) und d) erfüllt sein müssen:
  - a) isolierbar aus murinen myelomonozytären leukämischen Zelllinien;
  - b) isolierbar aus bestrahlten humanen Knochenmarkstromazelllinien;
  - c) induziert Differenzierung in Friend-Erythroleukämiezelllinien unter Hämoglobinbildung;
  - d) mit einem Molekulargewicht im Bereich von etwa 10 - 60 kDa, bestimmt durch Gelfiltration mit Sephacryl S300<sup>R</sup>;
  - e) mit einer Expression der zugehörigen mRNA in primären Zellen aus Thymus, foetaler Leber, adulter Milz oder Knochenmark;
  - f) mit charakteristischen Repeat-Strukturen in der für das Protein kodierenden cDNA;
  - g) mit zugehörigen mRNA-Spezies unterschiedlicher Größe, die aus gleichen 3'-Bereichen, aber unterschiedlichen 5'-Bereichen bestehen.
2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin zumindest eines der nachfolgenden Merkmale aufweist:
  - h) mit einer stabilen Expression der zugehörigen mRNA in vitro, wenn eine allogene Milzzell-Reaktion mit

unbestrahlten, nicht vorbehandelten Milzzellen der Mausstämmen CBA und C57Bl6 durchgeführt wird;

- i) mit AT-reichen Abschnitten in der für das Protein kodierenden cDNA;
  - k) induzierbar durch einen im fötalen Kälberserum vorkommenden Serumfaktor;
3. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere der in Tabelle 3 gezeigten Repeatsequenzen oder mit diesen Repeatsequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisierende Repeatsequenzen in der für das Protein nach Anspruch 1 oder 2 kodierenden DNA vorliegen.
4. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es aus Humanzellen, Mauszellen oder den Kulturüberständen von Human- oder Mauszelllinien isolierbar ist.
5. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäureteilsequenz aufweist, die von einer mit der cDNA der SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO:4 hybridisierenden DNA kodiert wird.
6. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäureteilsequenz aufweist, die von einer mit der cDNA nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO:4 unter stringenten Bedingungen hybridisierenden DNA kodiert wird.
7. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Teile, Analoga und Derivate des Proteins sowie Fusions-

proteine, je kodierend für ein Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien, mit umfaßt sind.

8. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in im wesentlichen gereinigter, nativer Form.
9. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in im wesentlichen rekombinanter Form.
10. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien und/oder mit Wachstumsfaktoraktivität und/oder koloniestimulierender Wirkung.
11. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es einen differenzierungsinduzierenden Effekt auf menschliche Leukämiezelllinien aufweist.
12. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäureteilsequenz gemäß SEQ ID NO:3 oder NO:5 aufweist, wobei eine oder mehrere der Aminosäuren deletiert, substituiert oder hinzugefügt sein können, je mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien.
13. DNA-Fragment gemäß SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO.4 oder ihr komplementärer Strang, Teile, Derivate und Analoga hiervon, je kodierend für ein Polypeptid mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien.
14. DNA-Fragmente, Teile, Analoga und Derivate hiervon, je kodierend für ein Polypeptid mit zumindest differenzie-

rungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämie-zelllinien , die mit der cDNA nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO:4 hybridisieren und/oder die durch den genetischen Code degeneriert sind.

15. DNA-Fragmente, Teile, Analoga und Derivate hiervon, je kodierend für ein Polypeptid mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien, die mit der cDNA nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO:4 unter stringenten Bedingungen hybridisieren und/oder die durch den genetischen Code degeneriert sind.
16. DNA-Fragment nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zumindest für einen Teil eines Polypeptids kodiert, welches die Aktivität des menschlichen oder murinen Proteins mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche besitzt.
17. Rekombinanter Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine DNA-Sequenz enthält, die einem Gen oder einem DNA-Fragment entspricht, das für ein Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche kodiert.
18. Rekombinanter Vektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er von einem bakteriellen Plasmid, einem Bakteriophagen oder von einem viralen Vektor abgeleitet ist.
19. Wirtszelle, transformiert von einem Vektor nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche.

20. Wirtszelle nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Prokaryontenzelle oder eine Eukaryontenzelle ist.
21. Verfahren zur Herstellung eines DNA-Fragments nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es das Screenen einer menschlichen oder murinen cDNA-Klonbank unter Verwendung eines DNA-Fragments einer DNA, die für ein murines oder menschliches Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien kodiert, als Sonde umfaßt.
22. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, der gegen mindestens ein Epitop eines Proteins mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche gerichtet ist.
23. Therapeutisches, diagnostisches oder experimentell nutzbares Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure in einer wirksamen Menge enthält, die mit einem Gen oder einem Teil hiervon hybridisiert, das für ein Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche kodiert.
24. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirksubstanz mindestens eine Nukleinsäure enthält, die (a) die für ein Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien kodierende Nukleotidsequenz, (b) einen Teil hiervon, (c) eine mit einer Nukleinsäure aus (a) und/oder



(b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz oder (d) eine zu einer Nukleotidsequenz aus (a), (b) und/oder (c) komplementäre Nukleotidsequenz umfaßt.

25. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine gegebenenfalls modifizierte DNA ist.
26. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine gegebenenfalls modifizierte RNA ist.
27. Therapeutisches Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Protein, ein Analogon, Derivat oder Teile hiervon nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, je mit der Funktion eines Polypeptids mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien zusammen mit üblichen Träger- und/oder Hilfsstoffen in einer wirksamen Menge enthält.
28. Verwendung eines Mittels nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche als molekulare Sonde in der Diagnostik oder Therapie.
29. Verwendung eines Mittels nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche als Antisense-Nukleinsäure zur Hemmung der Genexpression.
30. Verwendung einer für ein Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien kodierenden DNA, einem Teil, einem Derivat oder einem Analogon hiervon, je mit der

Funktion eines Polypeptids mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien zur Einbringung in eine Prokaryonten- oder Eukaryontenzelle.

31. Fusionsprotein mit einer Aminosäuresequenz, die in ihrer Gesamtheit oder zum Teil aus der Aminosäuresequenz von menschlichem oder murinem Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche und einem Teil eines prokaryontischen und/oder eukaryontischen Proteins besteht.
32. Synthetisches Protein mit zumindest differenzierungsinduzierender Aktivität für Friend-Erythroleukämiezelllinien nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche mit einer Aminosäuresequenz, die von einer DNA-Sequenz zumindest teilweise kodiert wird, die mit der DNA-Sequenz nach SEQ ID NO:1 oder NO:2 oder NO:4 zumindest unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
33. Verwendung eines Proteins nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche oder der Inhibitoren dieses Proteins zur Behandlung von Erkrankungen, bei denen eine lokale oder systemische Über- oder Unterproduktion dieses Proteins auf die Krankheitsentwicklung oder ihren Verlauf einen Einfluß nimmt.
34. Verwendung eines Proteins nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche als Wachstumsfaktor, koloniestimulierenden Faktor, die Erythropoese und/oder das Immunsystem induzierenden Faktor.
35. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zumindest die Aminosäuren umfaßt, die von den Nukleotiden 74 - 154 oder 155 - 685 kodiert werden.

1/23

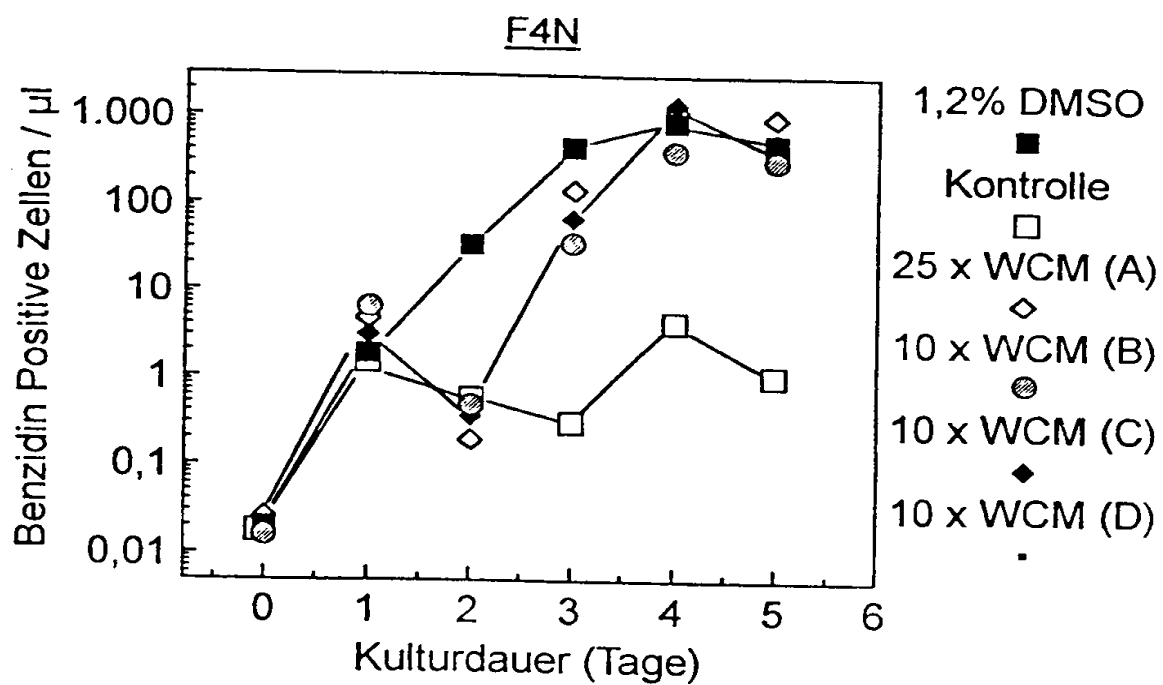


Abb. 1



2/23

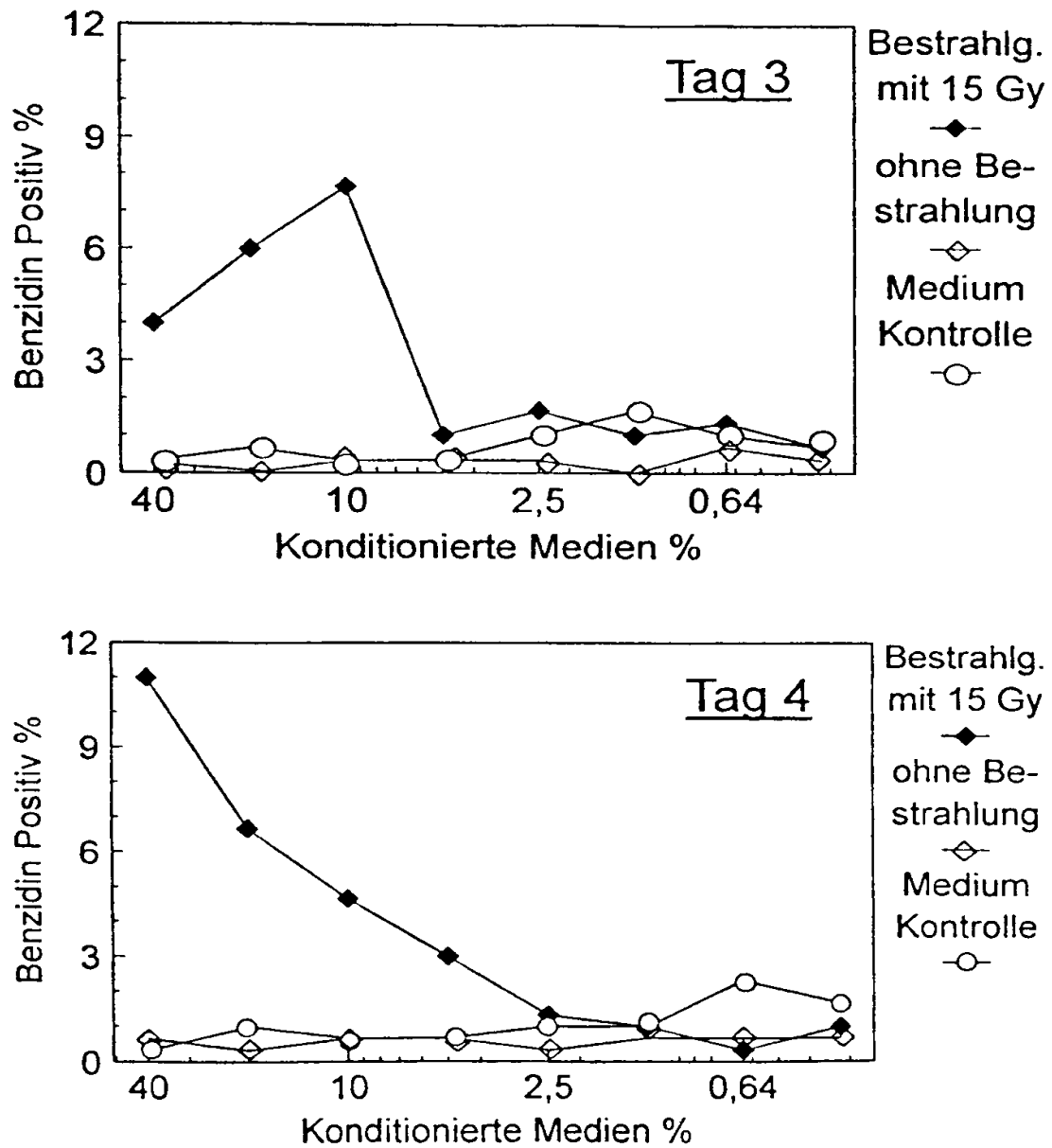


Abb. 2



3/23

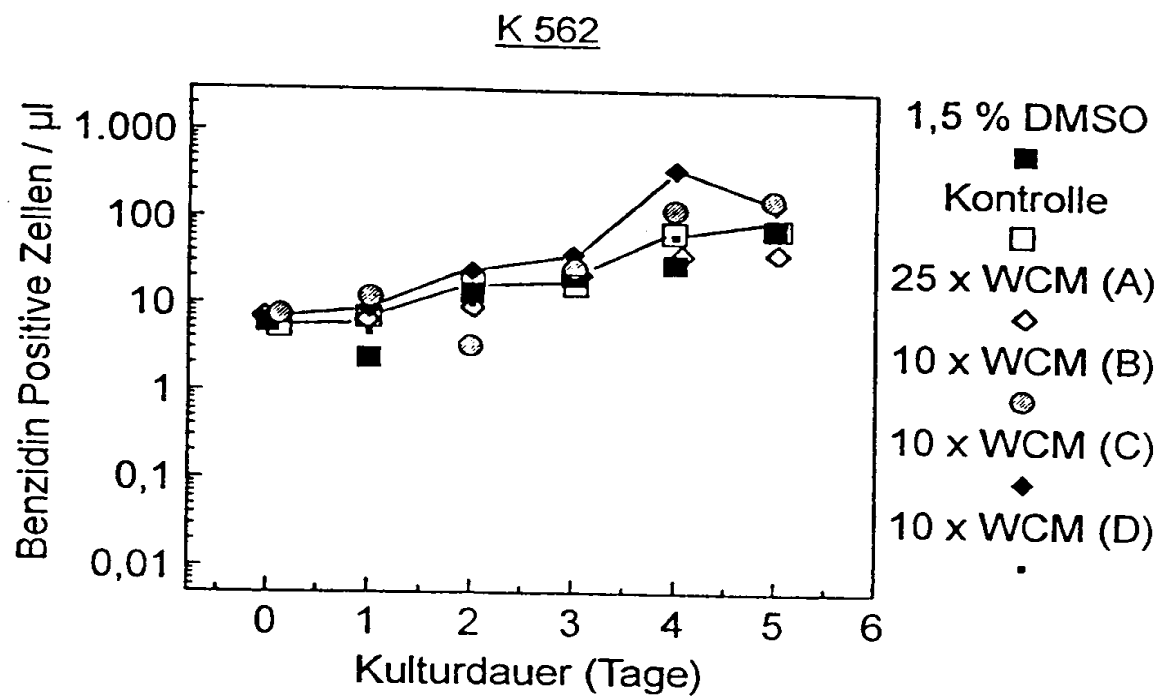


Abb. 3





4/23

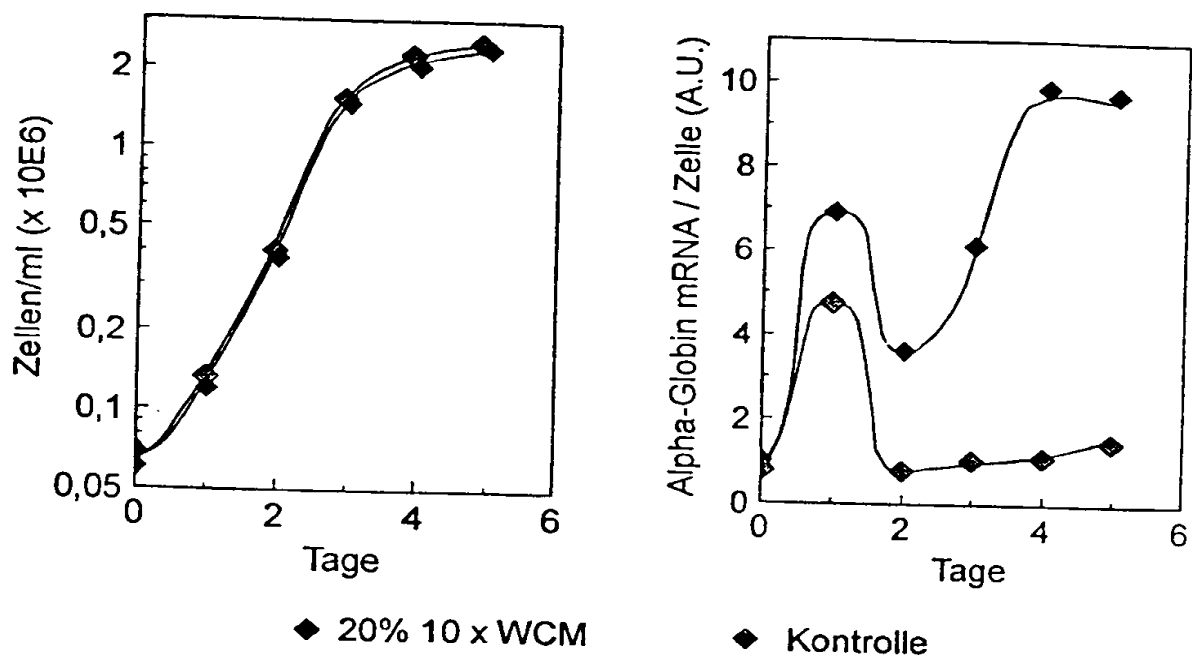


Abb. 4



5/23

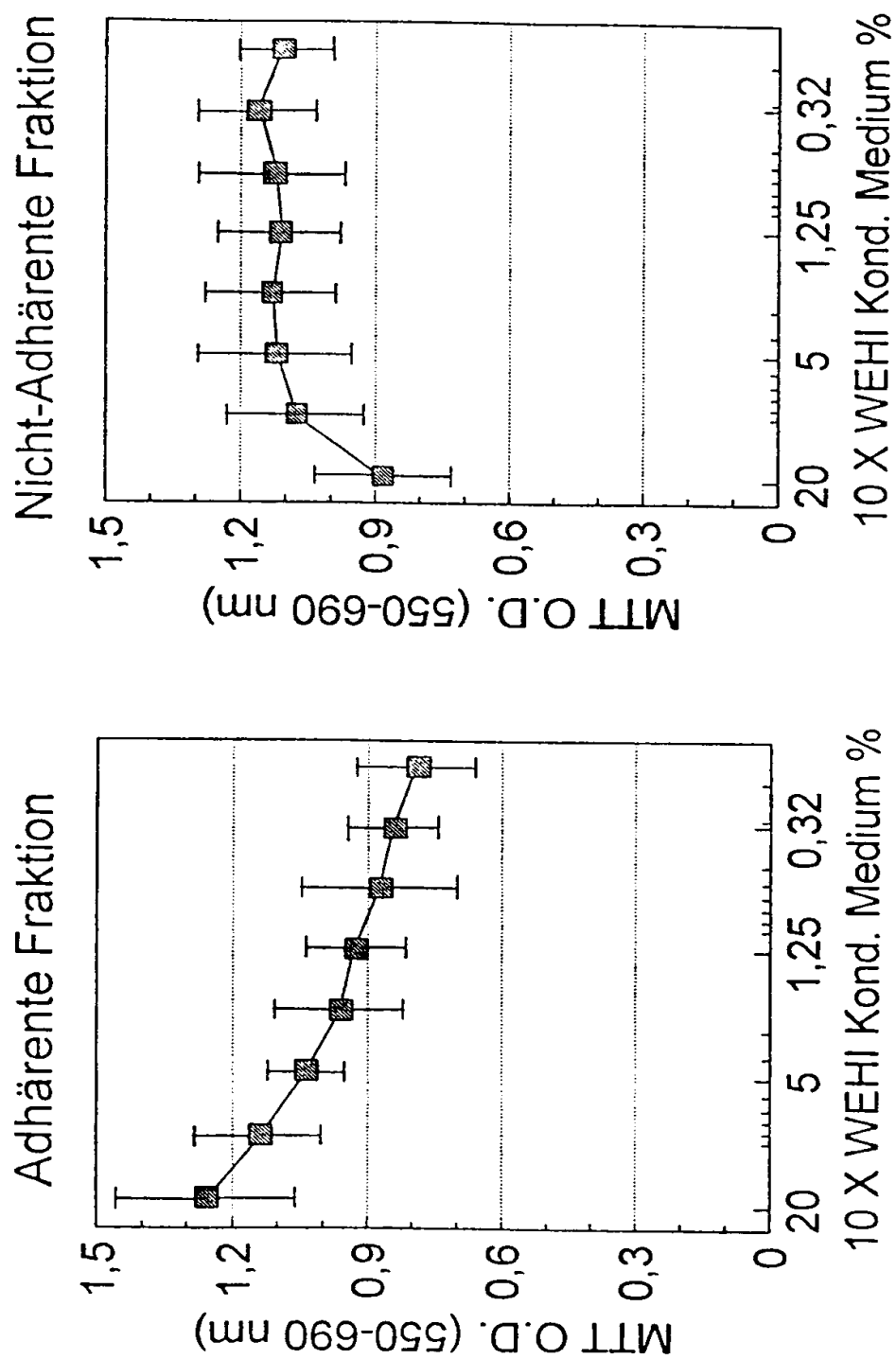


Abb. 5



6/23

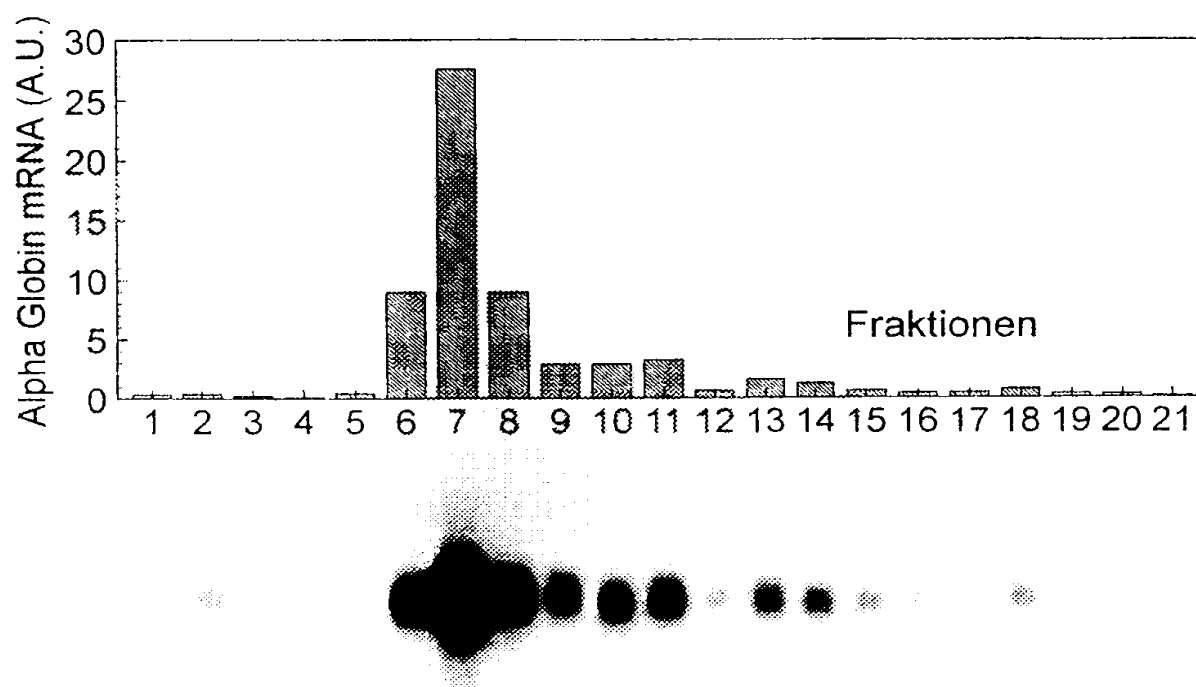


Abb. 6



7/23

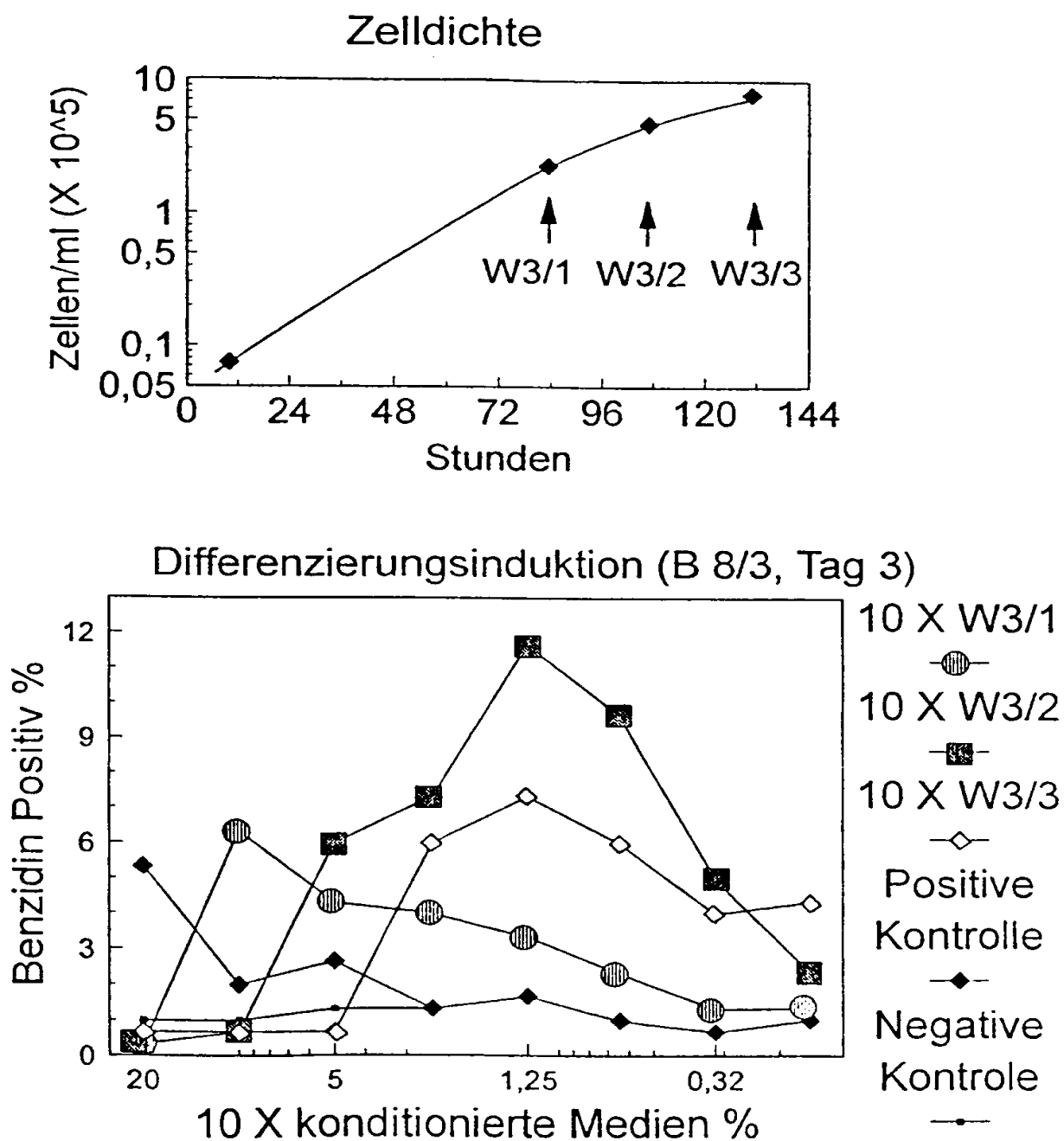


Abb. 7





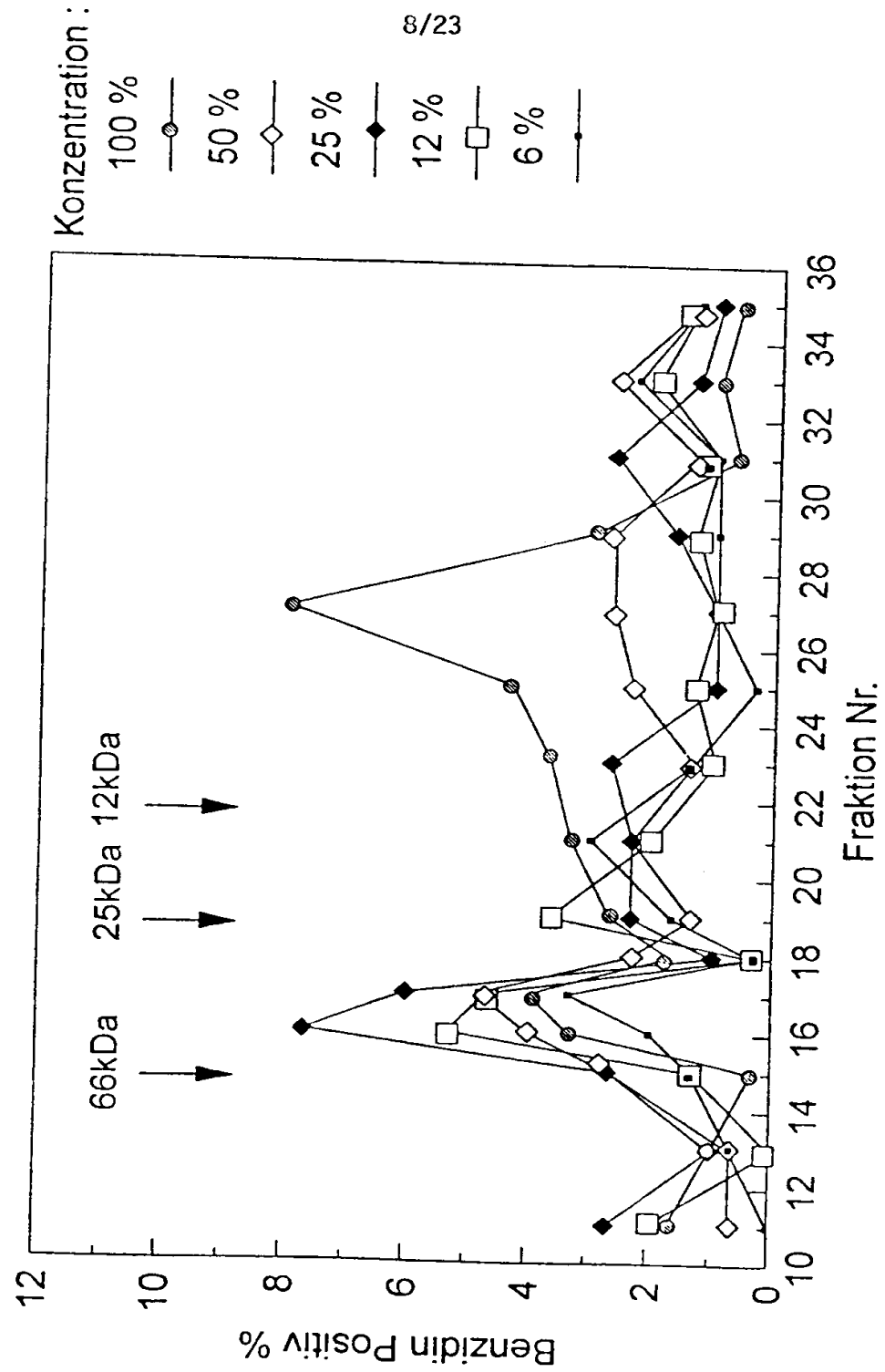


Abb. 8



9/23

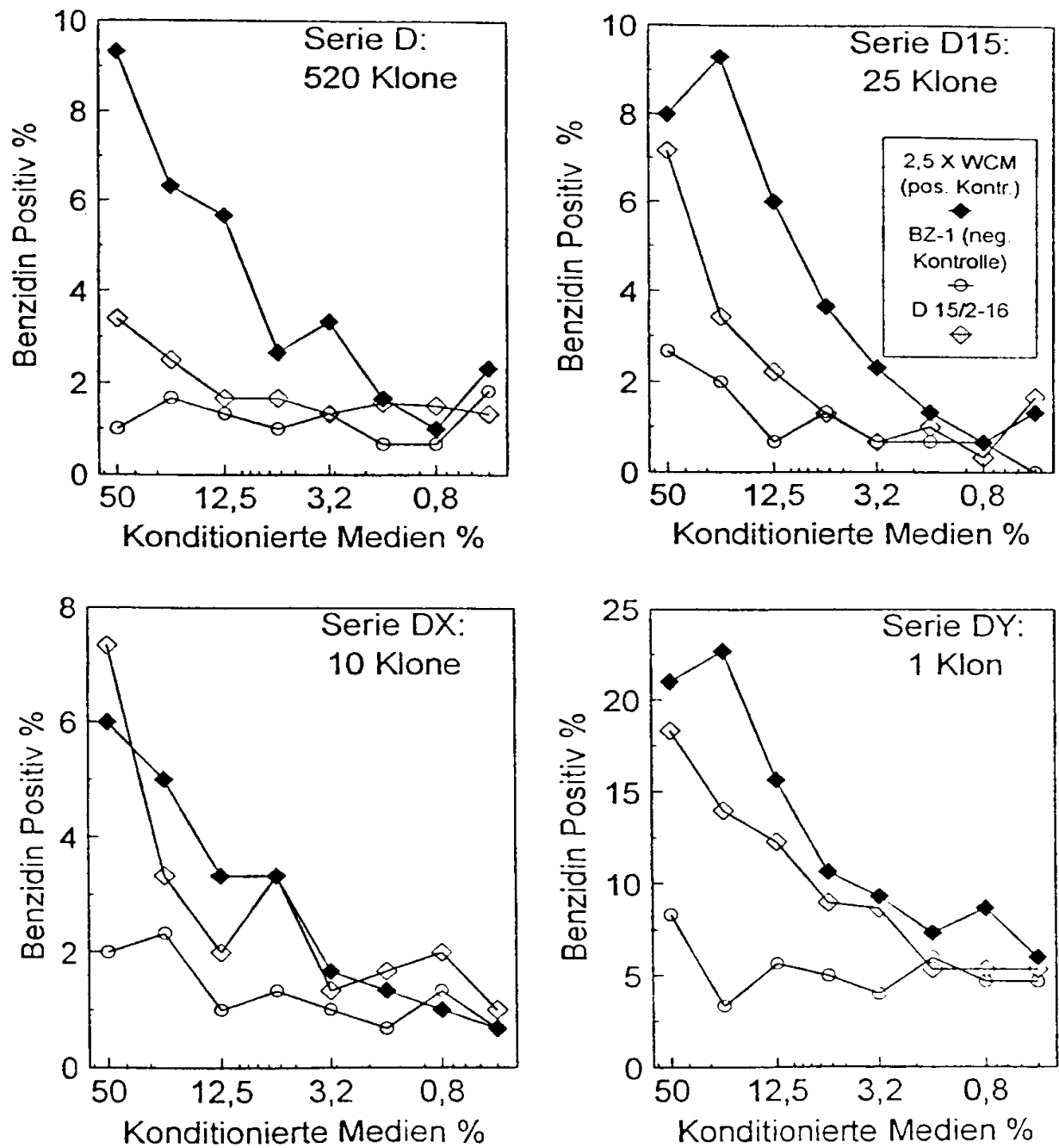


Abb. 9



10/23

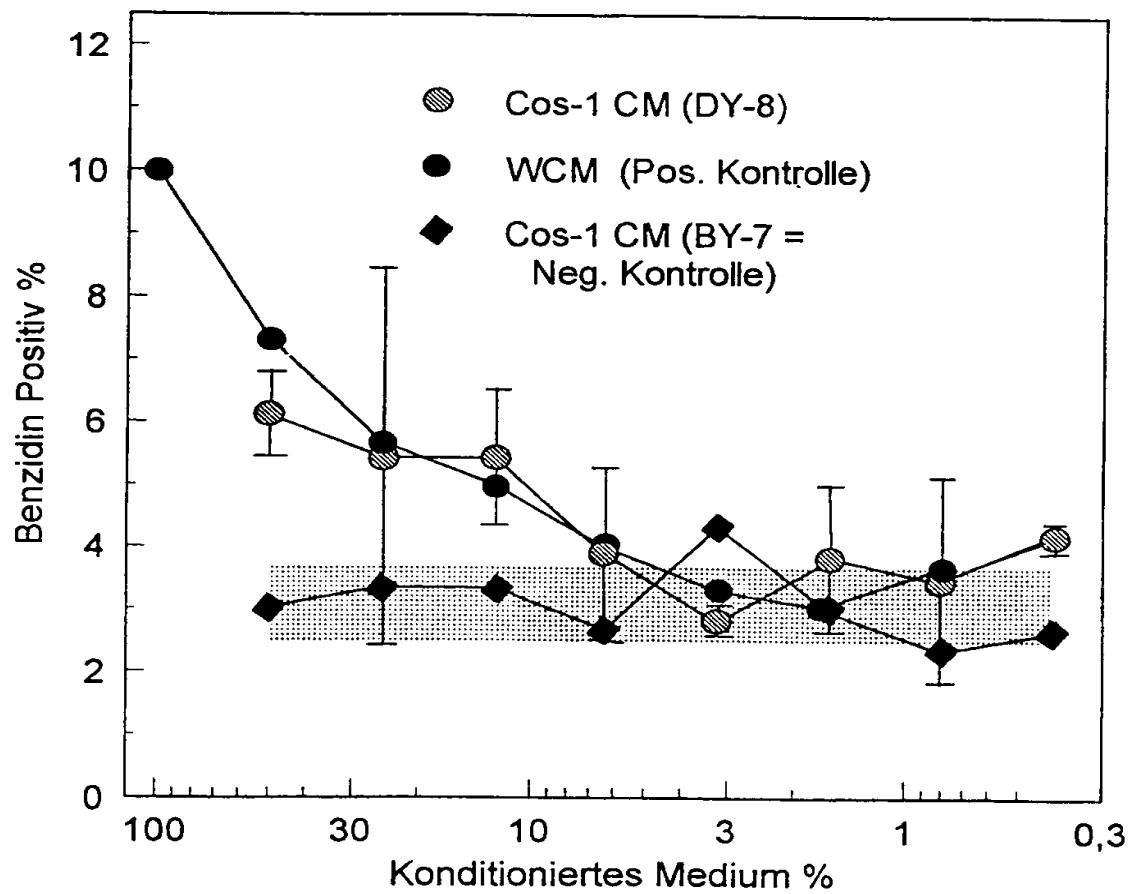


Abb.10



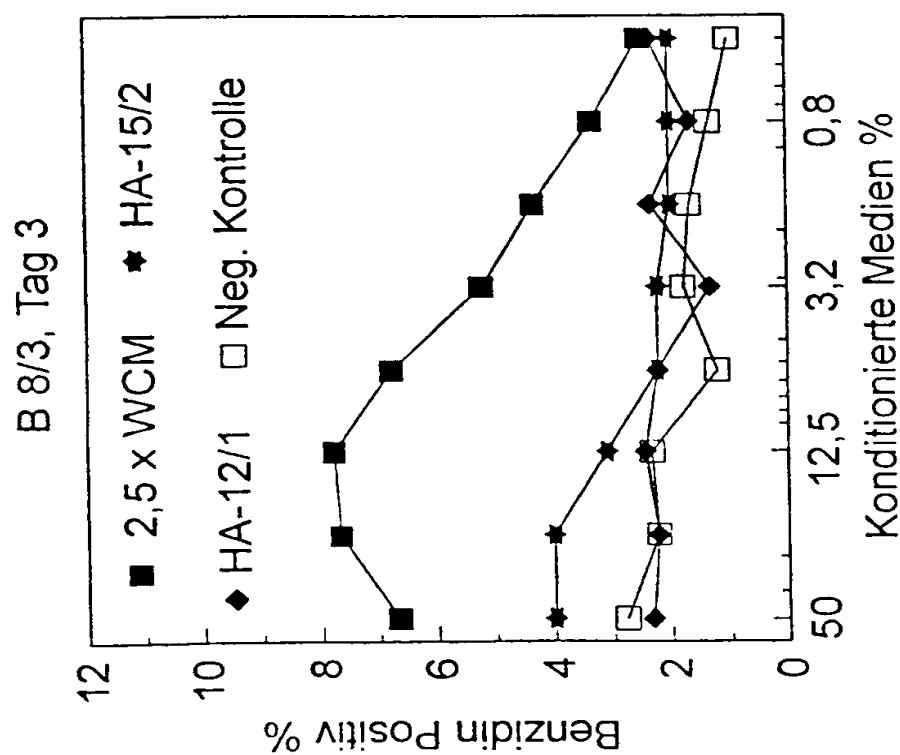
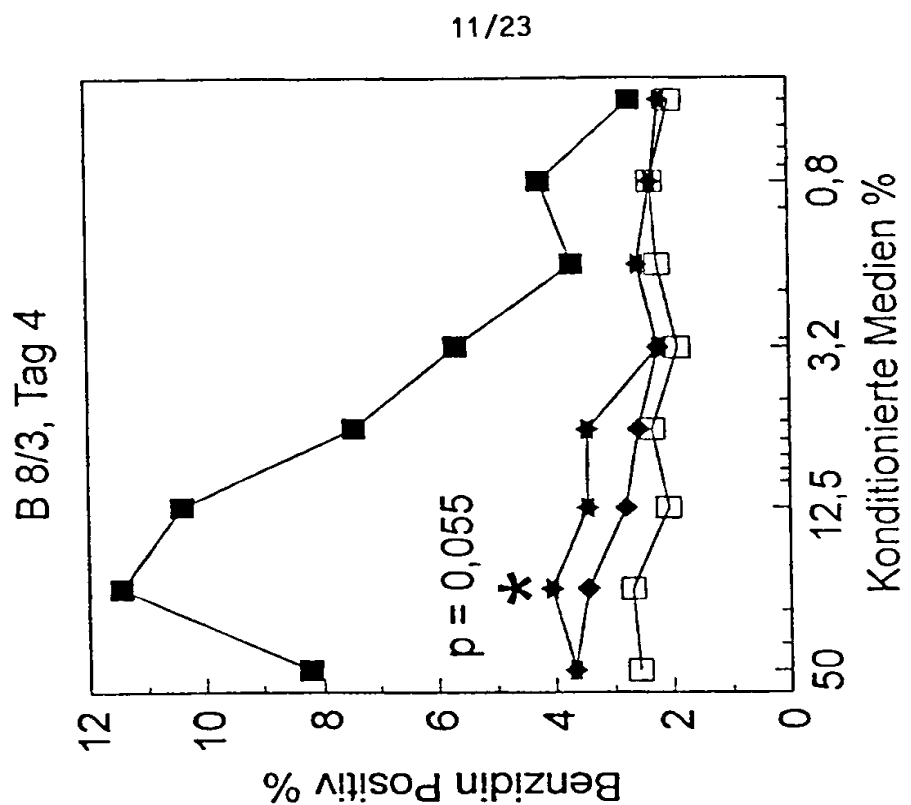


Abb. 11





12/23



Abb. 12



13/23

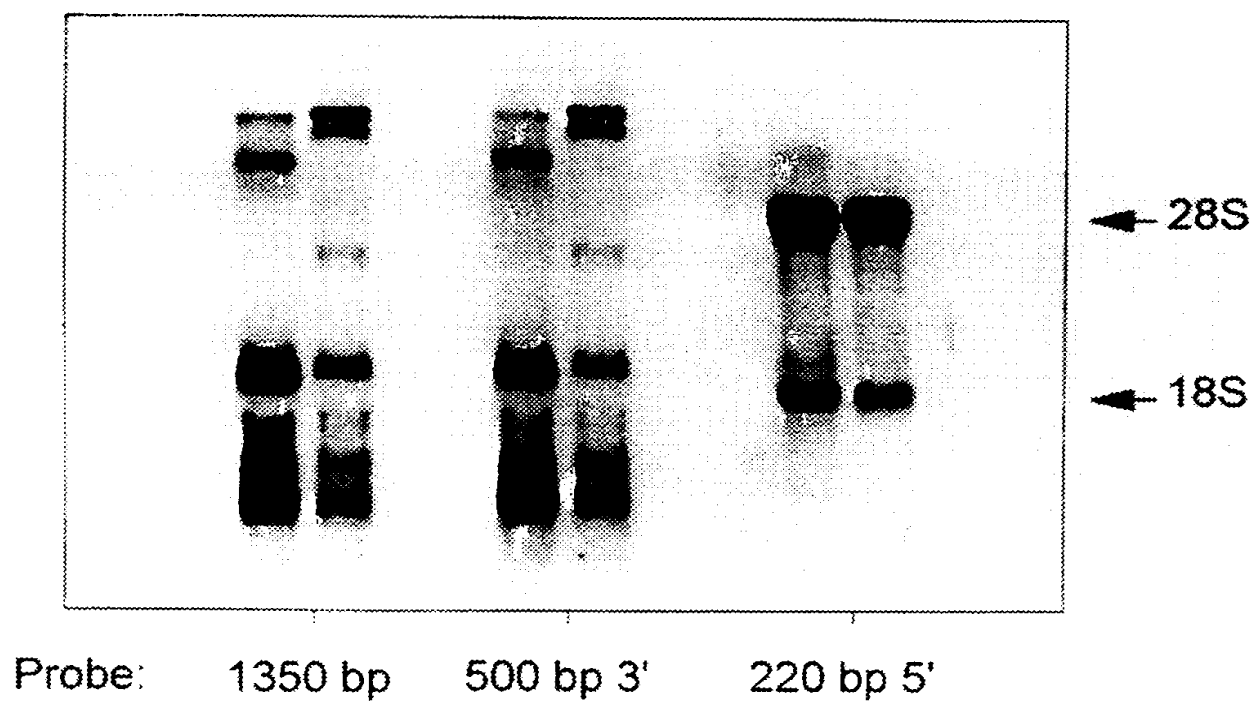


Abb. 13



14/23

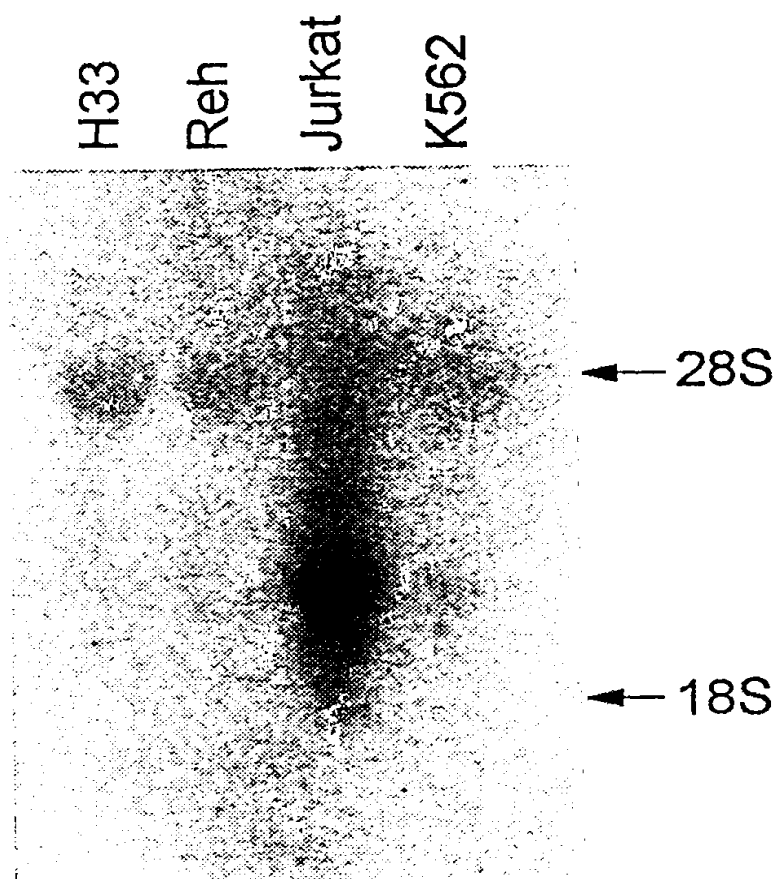


Abb. 14



15/23

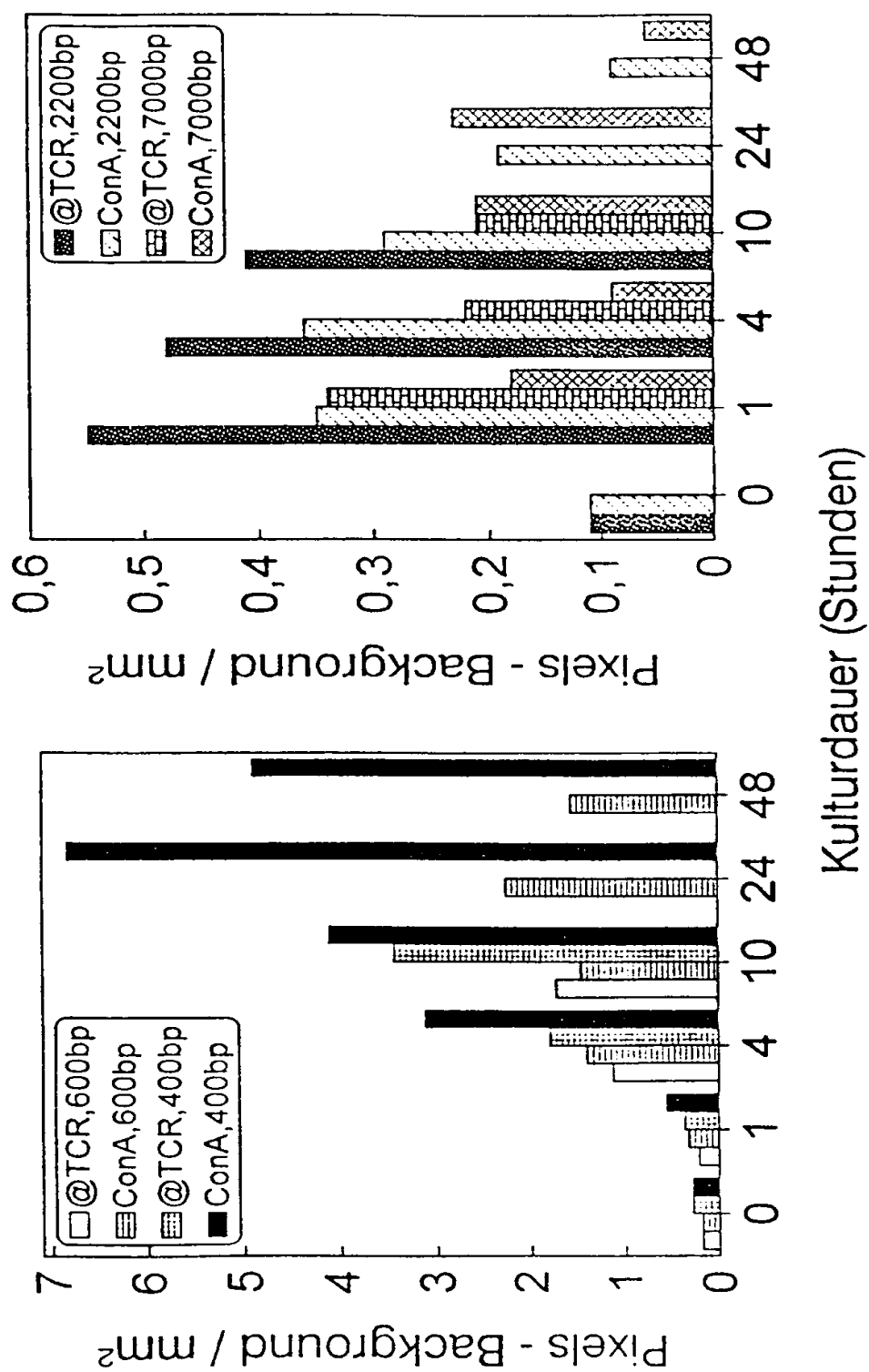


Abb. 15





16/23

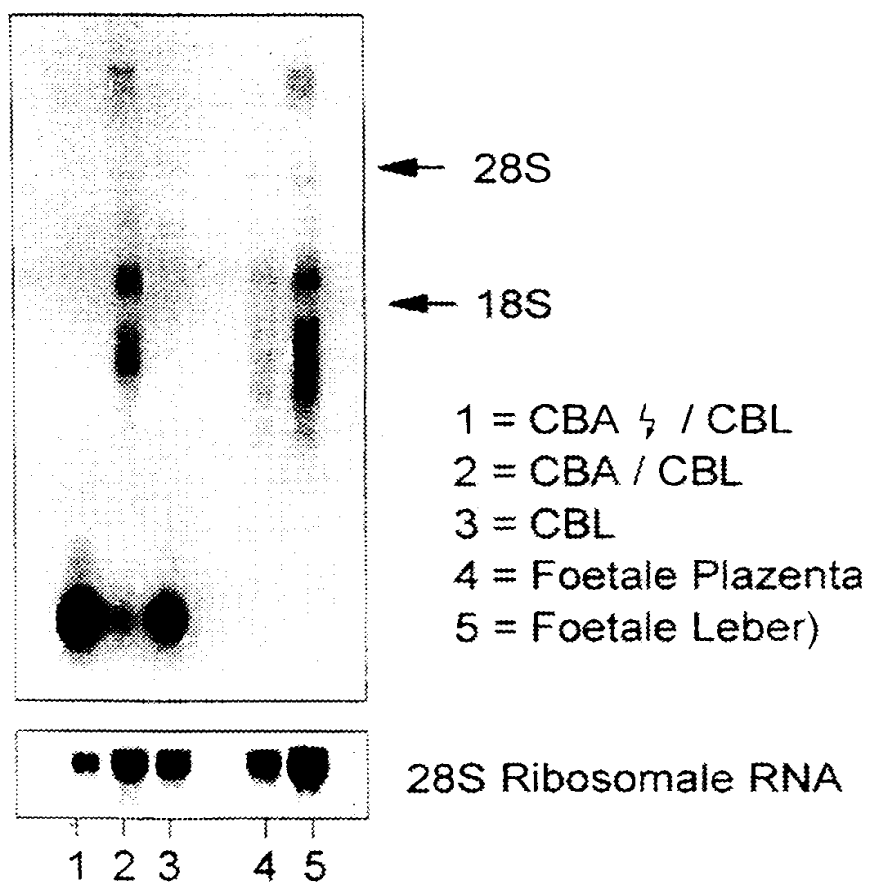


Abb. 16



17/23

Transplantation von CBA X CBL    ○—○  
oder CBL Milzzellen            ●—●

eda Expression in % der CBL Milz eda Expression am Tag 0

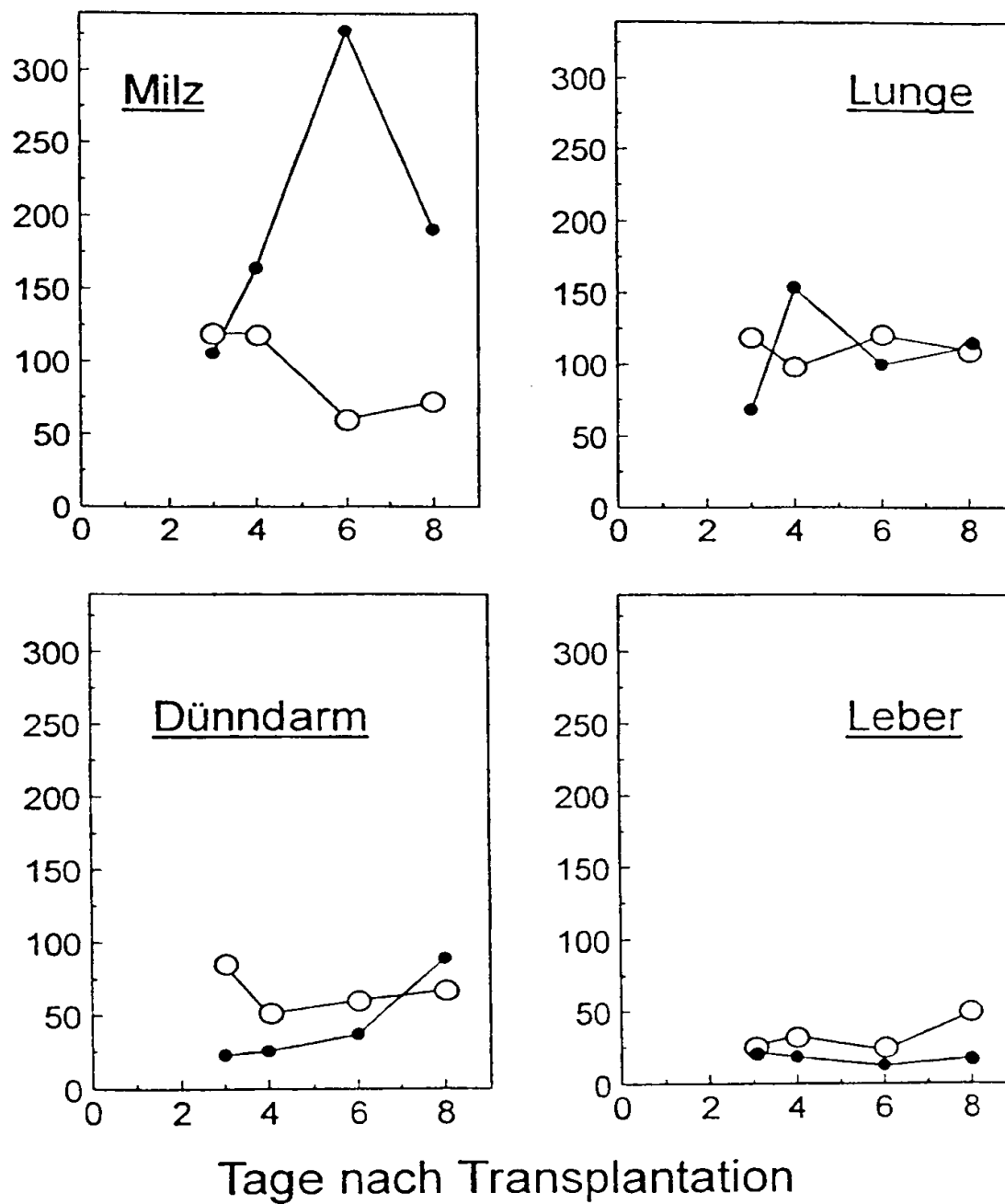


Abb. 17



18/23

```
1  CCGACCGTGC  GGACTTAAGA  TGGAGGCACT  TCCTGTCTGC  GCGGGAAGA
51  GAAGGCTCGG  TCGGAGCCGG  GAATGCTGGG  ACTTGTAGTG  CGTAGTCAAT
101 GGTTCCTCTAT  GGGCTTTCAG  AGTGAGTGGC  GGAAGGCGG  CCCCAGGGCA
151 TGCTGGGAGT  TGAGTCCTG  CCGTCGTCAA  TGGTCTCTA  TGGGCTTCA
201 GAGTGAGTGG  CGGGAAGGCG  GCCCCGAGGC  ATGCTGGGAG  TTGTAGTCCT
251 GCCATAGTCA  ATGGTTCTCT  ATGGGCTTTC  AGACTGAGTG  GCGGGAAGGC
301 GGCCCCGAGG  CATGCTGGGA  GTTGCAGCGC  CATGTTTAA  AGCACGCGTT
351 TCTCTGTATA  GACCTGGCTG  TGGATTTTTC  GCTAATCTT  TTTTGTAGCT
401 TTATTTTAA  TTTTACTTT  TTCACACAGG  ATTTCTCTT  ATAGCCTTGG
451 CTACCGTTTT  TTCCCTAATT  ATTCTCCTTT  TCATTTGGT  TTATTTTTTT
501 TTAATTTTGG  TTTTTTAAG  ACAGGGTTTC  TCTGTATAGA  CCTGGCTGTG
551 GATTTCTCAC  TAATTATTTT  TTTTAGCTTT  ATTTTAAAT  TTTTATTTT
601 CACACAGGAT  TTCTCTTTAT  AGCCTTGGCT  ACCGTTTTT  CCGTAATTAT
651 TCTTATTTTC  ATTTTGGTTT  ATTTTAAAT  TTTAATTTT  GATTTTGGAG
701 ACAGGGTTTC  TCTTTTAGCC  GCAGCTATGG  TTTCTGCCCT  AATTATTCTT
751 GTCCTTATTT  GTAATTTAAT  TCTTAATTTA  ATTTAATTTA  TAATTTTGTT
801 GTAAGTTTTT  CTGTGGGCGT  GAATGGAAAG  TCTAACCCGT  GTTCTCTGT
851 TCAGCGTCCG  CCGGTCACGG  CCGCCGCCCC  CAGCGACGTC  ACCCACACGC
901 GCAGAAGCGG  ACGCCGCGGT  CAAGATGTCT  CTGCCATGCC  CACGGGACGC
951 ACGGACGCAC  GGACGGACGG  ACGGACTCCA  CAAGGTAGGA  AGCCTGCGCC
1001 GACCGCACCG  CCGCACCCAC  CACAGCACAC  AGGACACACG  CGGGCCCCGC
1051 GCCCGCCCAG  GCACACGCGG  CACACACGGC  ACACACGGCA  GGCAGGCCAG
1101 GCACACGCAT  CCGCAGGACC  CGCCGCACCC  GCCACGCAGA  CACGGACGAG
1151 CCGCCGCGGT  CAAGATGTTT  ACCCGCCGCG  GTCAAGATGT  ATGTGCCACC
1201 GACCCTCGCC  CCGCTGGACG  GACGGACGGA  CGCACGCACG  CCGTCAGCGT
1251 CCACCGGTCA  CTGCCGCCGC  CCACAGTGAT  GTCACCCACG  AAAGCACACA
1301 CGTAGAAGCG  GACGCCGTGG  TCAAGATGTC  TCTGCCATCC  CCACAGGACG
1351 GACGGACGGA  CTCCACAAGG  TGC GCGTGT  GCCGAGGCCG  CCAGGACGGA
1401 GCGATTCTCA  CGGAGGAAGG  AGCACGCCAA  CAGGGCCTGA  CTGCGTACAG
1451 ACATGTCCCC  CTCAATAAAA  TTGCAGTTGA  AATGGAAAAA  AAAAA
```

Abb. 18



19/23

Vorläufige Struktur der *eda* 2.2 kbp cDNA

\* = Stopcodon, R = Repeat

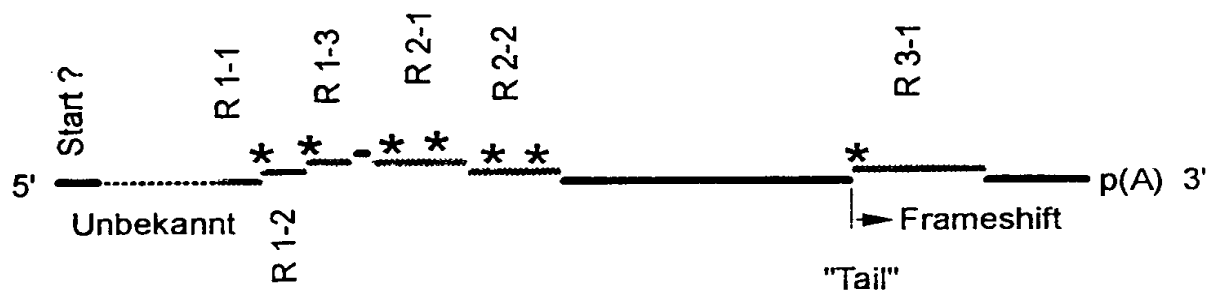


Abb. 19





20/23

1 CGCGCCCGCC CGGGATCCCC AGCTGCCGCC GCGCCCGCCC GCCCGCCCGG  
51 GGCCCCCGCT GCAGAACCGT GACCGTCCGC CGGTCACGGC CGCCGCCCCC  
    ATGGGGCT GCAGAACCGT GACCGTCCGC CGGTCACGGC CGCCGCCCCC  
101 AGCGACGTCA CCCACACGCG CAGAAGCGGA CGCCGCGGTC AAGATGTCTC  
    AGCGACGTCA CCCACACGCG CAGAAGCGGA CGCCGCGGTC AAGATGTCTC  
151 TGCCATGCCC ACGGGACGCA CGGACGCACG GACGGACGGA CTGACTCCAC  
    TGCCATGCCC ACGGGACGCA CGGACGCACG GACGGACGGA CTGACTCCAC  
201 AAGGTAGGAA GCCTGCGCCG ACCGCACCGC CGCACCCACC ACAGCACACA  
    AAGGTAGGAA GCCTGCGCCG ACCGCACCGC CGCACCCACC ACAGCACACA  
251 GGACACACGC GGGCCCCGCG CCCGCCCAGG CACACGCGGC ACACACGGCA  
    GGACACACGC GGGCCCCGCG CCCGCCCAGG CACACGCGGC ACACACGGCA  
301 CACACGGCAG GCAGGCCAGG CACACGCATC CGCAGGACCC GCCGCACCCG  
    CACACGGCAG GCAGGCCAGG CACACGCATC CGCAGGACCC GCCGCACCCG  
351 CCACGCAGAC ACGGACGAGC CGCCGCGGTC AAGATGTTCA CCCGCCGCGG  
    CCACGCAGAC ACGGACGAGC CGCCGCGGTC AAGATGTTCA CCCGCCGCGG  
401 TCAAGATGTA TGTGCCACCG ACCCTCGCCC CGCTGGACGG ACGGACGGAC  
    TCAAGATGTA TGTGCCACCG ACCCTCGCCC CGCTGGACGG ACGGACGGAC  
451 GCGCGCACGC CGTCAGCGTC CACCGGTCAC TGCCGCCGCC CACAGTGACG  
    GCGCGCACGC CGTCAGCGTC CACCGGTCAC TGCCGCCGCC CACAGTGACG  
501 TCACCCACGA AAGCACACAC GTAGAAGCGG ACGCCGTGGT CAAGATGTCT  
    TCACCCACGA AAGCACACAC GTAGAAGCGG ACGCCGTGGT CAAGATGTCT  
551 CTGCCATCCC CACAGGACGG ACGGACGGAC TCCACAAGGT GCGCGTGTCG  
    CTGCCATCCC CACAGGACGG ACGGACGGAC TCCACAAGGT GCGCGTGTCG  
601 CCGAGGCCGC CAGGATGGAG CGATTCTCAC GGAGGAAGGA GCACGCCAAC  
    CCGAGGCCGC CAGGATGGAG CGATTCTCAC GGAGGAAGGA GCACGCCAAC  
651 AGGGCCTGAC TCGGTACAGA AATGCCCCC CTCAATAAAA TTGCAGTTGA  
    AGGGCCTGAC TCGGTACAGA AATGCCCCC CTCAATAA  
701 AATGGAAAAA AAAAA

Abb. 20



21 / 23

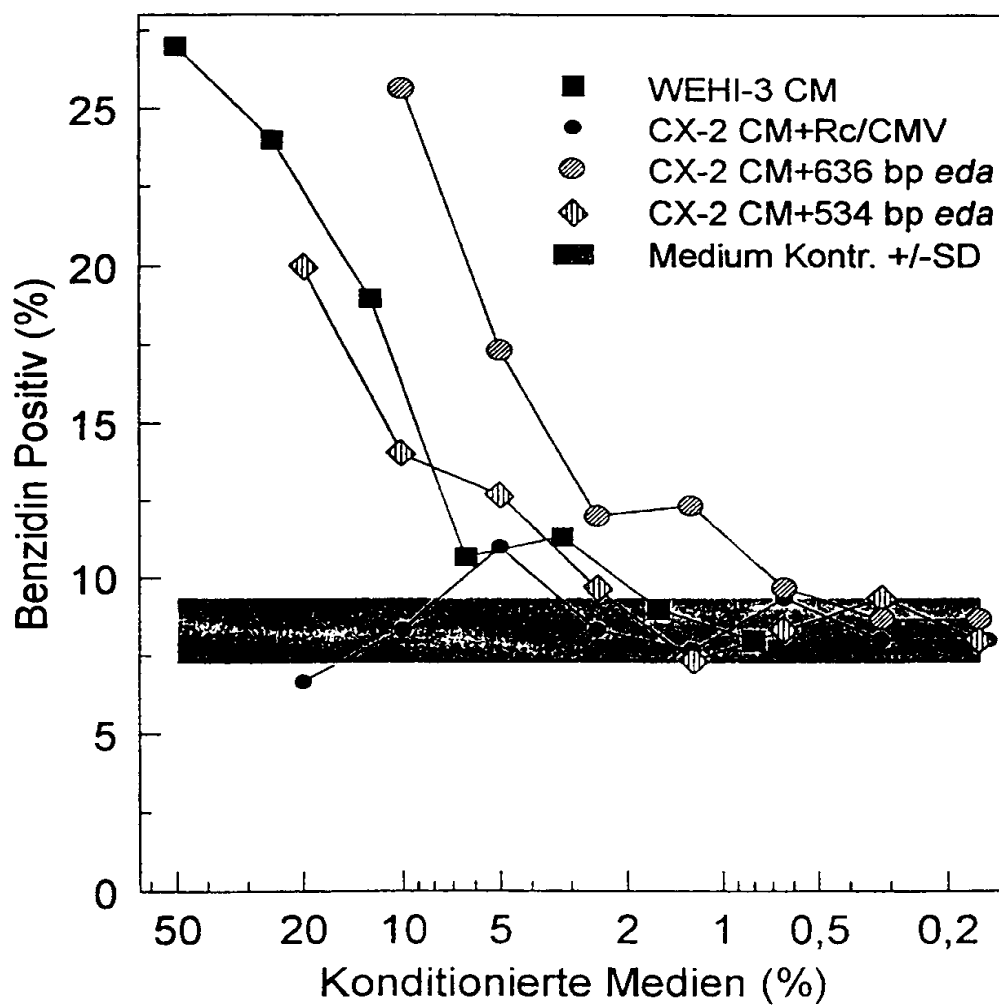
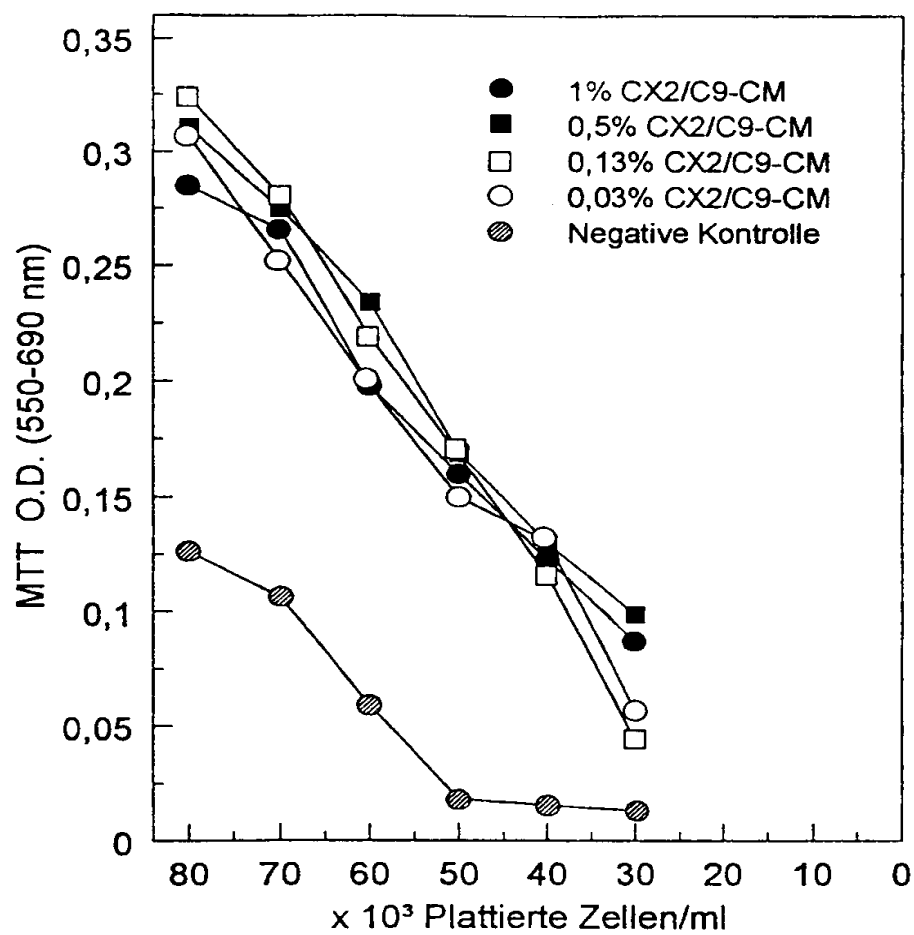


Abb. 21



22/23

A



B

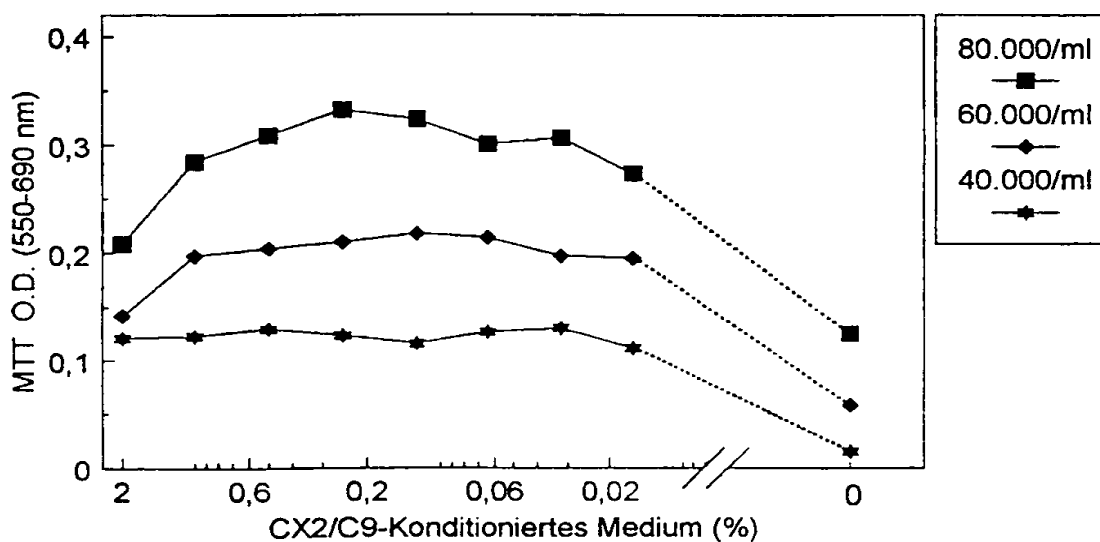
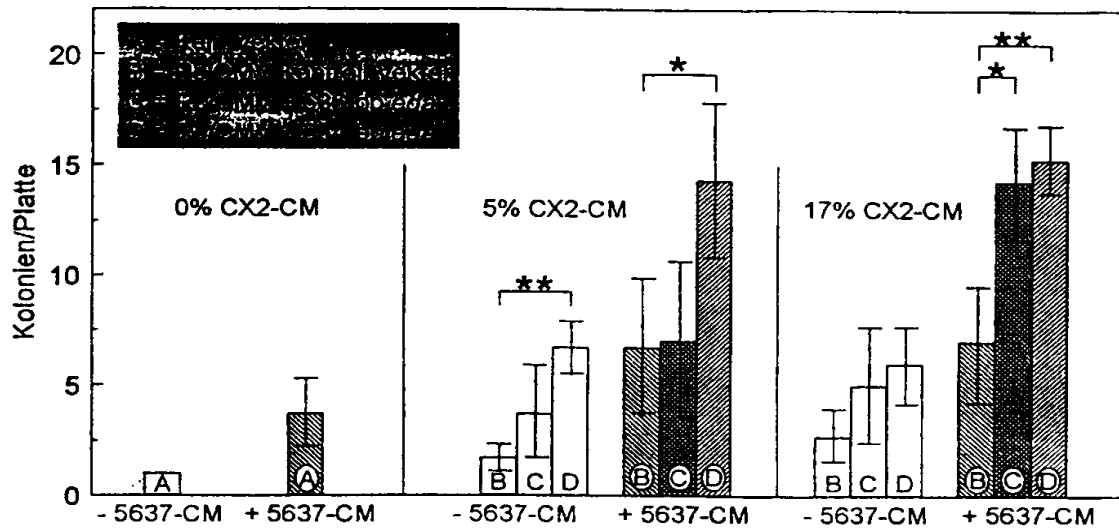


Abb. 22



23/23

A



B

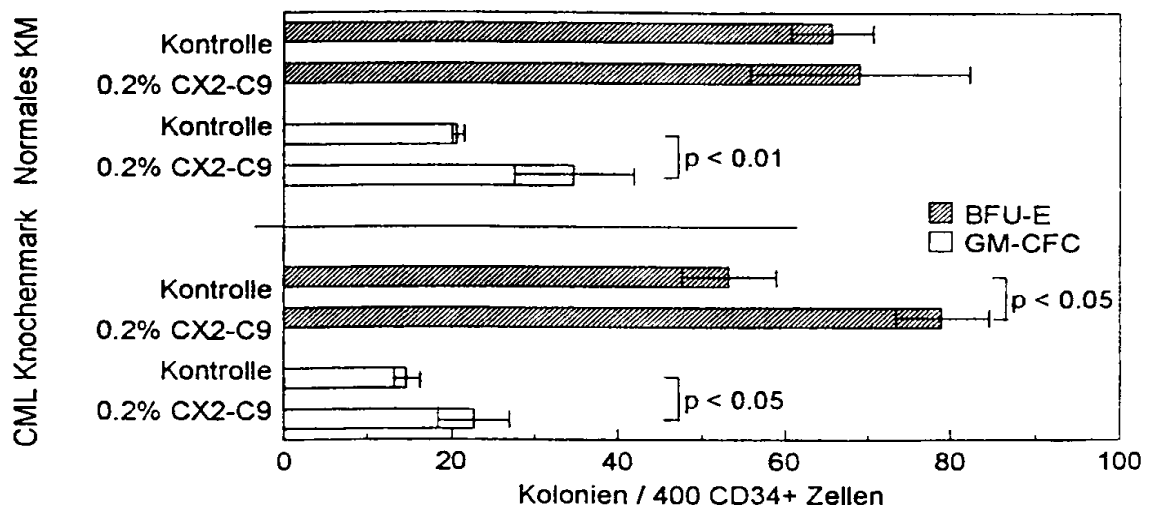


Abb. 23





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.  
PCT/EP 97/01590

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/475 C12N5/10 C07K16/22 A61K31/70  
A61K48/00 A61K38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XXI ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, PROVIDENCE, RHODE ISLAND, USA, JULY 26-30, 1992. EXP HEMATOL (N Y), 20 (6). 1992. 758., XP002036195 DOERMER P ET AL: "DIFFERENTIATION INDUCING ACTIVITY FROM WEHI-3B CELLS" see abstract	1-4, 8-11,22
Y	--- BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 142, no. 3, 1987, ORLANDO, FL US, pages 1095-1103, XP002036196 ETO Y ET AL: "Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1" see the whole document --- -/-	1-4, 8-11,22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July 1997

Date of mailing of the international search report

14.08.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/01590

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BIOTECHNOL BIOENG, 31 (7). 1988. 675-681., XP000677733 TSUJI T ET AL: "DISCOVERY OF A HUMAN ERYTHROID DIFFERENTIATION FACTOR EDF AND ITS LARGE-SCALE PRODUCTION" see abstract; table 1 ---	1-4, 8-11,22
Y	WO 89 04668 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI ;SCRIPPS CLINIC RES (US); UNIV CALI) 1 June 1989 see claims 1-12 ---	1-4, 8-11,22
Y	WO 95 14078 A (CAMERON ROBERT B) 26 May 1995 see claims 1-20 ---	1-4, 8-11,22
A	NATURE, JUN 16-22 1983, 303 (5918) P629-31, ENGLAND, XP000676737 WHETTON AD ET AL: "Effect of haematopoietic cell growth factor on intracellular ATP levels." ---	
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 80, 1983, WASHINGTON US, pages 2931-2935, XP000676739 GREENBERGER JS ET AL: "Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines" -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ EP 97/01590

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see annex
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Remark: Although claims 28, 29, 33 and 34 relate to a method for treatment of the human or animal body (diagnostic procedure done on the human or animal body), the search was carried out, based on the alleged effects of the compound or composition.

#### LACK OF CLARITY

Reason: Claim 35

The information given in claim 35 does not make clear to what specific sequence the nucleotides 74-154 or 155-685 relate.

claims fully searched:	1-27, 30-32
claims not fully searched:	28, 29, 33, 34
claims not searched:	35

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/01590

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8904668 A	01-06-89	US 5032507 A	16-07-91
		AU 628309 B	17-09-92
		AU 2714088 A	14-06-89
		CA 1329762 A	24-05-94
		DE 3879685 A	29-04-93
		EP 0346413 A	20-12-89
		JP 2502019 T	05-07-90
-----			
WO 9514078 A	26-05-95	US 5599705 A	04-02-97
		AU 1082895 A	06-06-95
-----			



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 97/01590

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 C12N15/12 C07K14/475 C12N5/10 C07K16/22 A61K31/70 A61K48/00 A61K38/18		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	XXI ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, PROVIDENCE, RHODE ISLAND, USA, JULY 26-30, 1992. EXP HEMATOL (N Y), 20 (6). 1992. 758., XP002036195 DOERMER P ET AL: "DIFFERENTIATION INDUCING ACTIVITY FROM WEHI-3B CELLS" see abstract ---	1-4, 8-11,22
Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 142, Nr. 3, 1987, ORLANDO, FL US, Seiten 1095-1103, XP002036196 ETO Y ET AL: "Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1" siehe das ganze Dokument --- -/--	1-4, 8-11,22
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">29. Juli 1997</div>		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">14. 08. 97</div>
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Espen, J</div>

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 97/01590

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BIOTECHNOL BIOENG, 31 (7). 1988. 675-681., XP000677733 TSUJI T ET AL: "DISCOVERY OF A HUMAN ERYTHROID DIFFERENTIATION FACTOR EDF AND ITS LARGE-SCALE PRODUCTION" siehe Zusammenfassung; Tabelle 1 ---	1-4, 8-11,22
Y	WO 89 04668 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI ;SCRIPPS CLINIC RES (US); UNIV CALI) 1.Juni 1989 siehe Ansprüche 1-12 ---	1-4, 8-11,22
Y	WO 95 14078 A (CAMERON ROBERT B) 26.Mai 1995 siehe Ansprüche 1-20 ---	1-4, 8-11,22
A	NATURE, JUN 16-22 1983, 303 (5918) P629-31, ENGLAND, XP000676737 WHETTON AD ET AL: "Effect of haematopoietic cell growth factor on intracellular ATP levels." ---	
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 80, 1983, WASHINGTON US, Seiten 2931-2935, XP000676739 GREENBERGER JS ET AL: "Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines" -----	



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/01590

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Siehe Annex
2. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: \_\_\_\_\_

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 28, 29, 33, 34 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers (Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird,) beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

## UNKLARHEITEN

Grund : Anspruch 35

Es ist nicht ersichtlich, mit den im Anspruch 35 gemachten Angaben, auf welche spezifische Sequenz sich die Nukleotide 74-154 oder 155-685 beziehen.

vollständig recherchierte Patentansprüche: 1-27, 30-32

unvollständig recherchierte Patentansprüche: 28, 29, 33, 34

nicht recherchierte Patentansprüche: 35

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/01590

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8904668 A	01-06-89	US 5032507 A	16-07-91
		AU 628309 B	17-09-92
		AU 2714088 A	14-06-89
		CA 1329762 A	24-05-94
		DE 3879685 A	29-04-93
		EP 0346413 A	20-12-89
		JP 2502019 T	05-07-90
-----			
WO 9514078 A	26-05-95	US 5599705 A	04-02-97
		AU 1082895 A	06-06-95
-----			

